

(51) 国際特許分類6 C12P 19/26, C12N 1/21, 15/54, 5/16 // (C12P 19/26, C12R 1:19, 1:15)	A1	(11) 国際公開番号 WO98/12343 (43) 国際公開日 1998年3月26日(26.03.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03226 (22) 国際出願日 1997年9月12日(12.09.97) (30) 優先権データ 特願平8/244451 1996年9月17日(17.09.96) JP 特願平8/285066 1996年10月28日(28.10.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 小泉聡司(KOIZUMI, Satoshi)[JP/JP] 〒194 東京都町田市市中町3-9-10 Tokyo, (JP) 佐々木克敏(SASAKI, Katsutoshi)[JP/JP] 〒194 東京都町田市本町田1171-3-201 Tokyo, (JP) 遠藤徹夫(ENDO, Tetsuo)[JP/JP] 〒194 東京都町田市森野4-17-17 Tokyo, (JP) 田畑和彦(TABATA, Kazuhiko)[JP/JP] 〒194 東京都町田市森野4-17-9 Tokyo, (JP)	尾崎明夫(OZAKI, Akio)[JP/JP] 〒194 東京都町田市市中町3-9-13 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。	
(54)Title: PROCESSES FOR PRODUCING SUGAR NUCLEOTIDES AND COMPLEX CARBOHYDRATES		
(54)発明の名称 糖ヌクレオチド類および複合糖質の製造法		
(57) Abstract		
<p>A process for producing sugar nucleotides with the use of, as enzyme sources, a) an optionally treated culture of a microorganism capable of producing NTP from a nucleotide precursor, and b) an optionally treated culture of a microorganism capable of producing a sugar nucleotide from a sugar and NTP; a process for producing complex carbohydrates with the use of, as enzymes sources, the above-mentioned cultures a) and b), and c) an optionally treated culture of a microorganism, animal cells or insect cells capable of producing a complex carbohydrate from a sugar nucleotide and a complex carbohydrate precursor; a process for producing complex carbohydrates with the use of, as an enzyme source, an optionally treated culture of a microorganism, animal cells or insect cells capable of producing a complex carbohydrate from a sugar nucleotide and a complex carbohydrate precursor; and a process for producing N-acetylglucosamine-1-phosphate with the use of, as an enzyme source, an optionally treated culture of a microorganism having a potent galactokinase activity.</p>		

本発明は、a)ヌクレオチドの前駆物質からNTPを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物およびb)糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用いた糖ヌクレオチドの製造法、上記a)、上記b)およびc)糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液または該培養液の処理物、を酵素源として用いた複合糖質の製造法、糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用いた複合糖質の製造法およびガラクトキナーゼ活性の強い微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用いたN-アセチルグルコサミン-1-リン酸の製造法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SJ	スロヴェニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GW	ギニアビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴス ラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
CH	スイス	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LC	セントルシア				

明 細 書

糖ヌクレオチド類および複合糖質の製造法

技術分野

本発明は、細菌・ウイルス等の感染防御、心血管障害への適応および免疫治療等に有用な複合糖質の製造方法および該複合糖質の合成基質として重要である糖ヌクレオチドの製造方法に関する。

背景技術

糖ヌクレオチドの製造方法として、1) 化学合成法 [Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 28, 307 (1973)、Bull. Chem. Soc. Japan, 46, 3275 (1973)、J. Org. Chem., 57, 146 (1992)、Carbohydr. Res., 242, 69 (1993)]、2) 酵素を用いた製造方法 [J. Org. Chem., 55, 1834 (1990)、J. Org. Chem., 57, 152 (1992)、J. Am. Chem. Soc., 110, 7159 (1988)、特表平 7-508413、特表平 7-500248、W096/27670]、3) 酵母等の微生物菌体を用いる方法 (特公昭 45-2073、特公昭 46-40756、特公昭 47-1837、特公昭 47-26703、特公昭 49-8278、特開平 2-268692) 4) 耐塩性酵母の微生物菌体からの抽出法 (特開平 8-23993) 等が知られている。

1) の方法においては、高価なヌクレオシド-5'-リン酸 (以下、NMP と略す) のモルフォリデート誘導体や糖リン酸等が必要であり、2) の方法においては、ヌクレオシド-5'-二リン酸 (以下、NDP と略す)、ヌクレオシド-5'-三リン酸 (以下、NTP と略す)、ホスホエノールピルビン酸、糖リン酸等の高価な原料やピルビン酸キナーゼ等多数の酵素が必要であり、3) の方法においては菌体の乾燥処理等が必要である。4) の方法を含め、上記いずれの方法においても、原料として高価なヌクレオチドや糖リン酸等が用いられていたり、操作的に大量生産が困難であるため、今日に至るまで、糖ヌクレオチドの工業的規模での製造法は確立されていない。

複合糖質の製造法としては、1) 化学合成法 [Methods in Enzymol., 247, 193 (1994)、Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 21, 155 (1982)、Carbohydr. Res., 211, c1 (1991)]、2) 加水分解酵素 [Anal. Biochem., 202, 215 (1992)、Trends Biotechnol., 6, 256 (1988)] を用いる方法、および3) 糖転移酵素 (特開平 7-79792、特表平 7-500248、特公平 5-82200、W094/25614、特表平 9-503905、USP 5,583,042) を利用した方法が知られている。

1) の方法では立体選択的合成のためには保護基の導入が必須であり、2) の方法では収率・選択性が十分でなく、3) の方法においてはNDP、NTP、ホスホエノールピルビン酸、糖リン酸、あるいは糖ヌクレオチド等の高価な原料やピルビン酸キナーゼ等多数の酵素が必要であり、いずれの方法においても複合糖質の安価な工業的製造方法は確立されていない。また、安価なヌクレオチドの前駆物質および糖および複合糖質前駆物質のみを原料として、直接複合糖質を工業的に製造する方法は知られていない。

コリネバクテリウム属に属する微生物において、オロット酸を添加することによりUMPが生産されるとの報告がある [Amino Acid Nucleic Acid, 23, 107 (1971)]。また、オロット酸を原料にしてシチジン二リン酸コリンを生成する方法も知られている (特開平 5-276974)。

発明の開示

本発明の目的は、細菌・ウィルス等の感染防御、心血管障害への適応および免疫治療等に有用な複合糖質の製造方法および該複合糖質の合成基質として重要である糖ヌクレオチドの安価で効率的な製造方法を提供することにある。

本発明者らは、微生物を用いて、ヌクレオチドの前駆物質を原料とした複合糖質および糖ヌクレオチドの生産について鋭意検討を行った結果、ヌクレオチドの前駆物質および糖のみを原料として糖ヌクレオチドが効率的に生産できること、糖ヌクレオチドの生成に関与する遺伝子の発現を強化することにより、その生産性が向上することを見だし、さらに、該糖ヌクレオチドを生産可能な微生物、

および、糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物あるいは動物細胞あるいは昆虫細胞を利用し、ヌクレオチドの前駆物質および糖および複合糖質前駆物質のみを原料として効率的に複合糖質を生産できることを見だし本発明を完成するに至った。

本発明は、a) ヌクレオチドの前駆物質からNTPを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、b) 糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、およびc) 糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液または該培養液の処理物、を酵素源として用い、これら酵素源、ヌクレオチドの前駆物質、糖および複合糖質前駆物質を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造法、a) ヌクレオチドの前駆物質からNTPを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、およびb) 糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、を酵素源として用い、これら酵素源、ヌクレオチドの前駆物質および糖を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に糖ヌクレオチドを生成蓄積させ、該水性媒体中から糖ヌクレオチドを採取することを特徴とする糖ヌクレオチドの製造法、および糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、複合糖質前駆物質および上記に記載の糖ヌクレオチドの製造法により得られた糖ヌクレオチドを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造法を提供する。更に、ガラクトキナーゼ活性の強い微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源およびN-アセチルグルコサミンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にN-アセチルグルコサミン-1-リン酸を生成蓄積させ、該水性媒体中からN-アセチルグルコサミン-1-リン酸を採取することを特徴とするN-アセチ

ルグルコサミン-1-リン酸の製造法を提供する。

図面の簡単な説明

第1図は発現プラスミド p P A 3 1 および p P A C 3 1 の造成工程を示す。

第2図は g a l U、p p a 遺伝子発現プラスミド p N T 1 2 および p N T 3 2 の造成工程を示す。

第3図は g a l T、g a l K 遺伝子発現プラスミド p N T 2 5 の造成工程を示す。

第4図は g a l T、g a l K 遺伝子をコリネバクテリウム・アンモニアゲネスで発現するプラスミド p T K 7 の造成工程を示す。

第5図は g l m U、p p a 遺伝子発現プラスミド p N T 1 4 の造成工程を示す。

第6図は p g m 遺伝子発現プラスミド p N T 2 4 の造成工程を示す。

第7図は g l m M 遺伝子発現プラスミド p N T 4 4 の造成工程を示す。

第8図は g l k 遺伝子発現プラスミド p N T 4 6 の造成工程を示す。

第9図は p f k B 遺伝子発現プラスミド p N T 4 7 の造成工程を示す。

第10図は g a l K 遺伝子発現プラスミド p N T 5 4 の造成工程を示す。

第11図は m a n B、m a n C 遺伝子発現プラスミド p N K 7 の造成工程を示す。

第12図は p g m、p f k B 遺伝子発現プラスミド p N T 5 5 の造成工程を示す。

第13図は g m d、w c a G 遺伝子発現プラスミド p N K 8 の造成工程を示す。

第14図は n e u A 遺伝子発現プラスミド p T A 1 4 の造成工程を示す。

第15図は l g t C 遺伝子発現プラスミド p G T 3 の造成工程を示す。

第16図は l g t B 遺伝子発現プラスミド p N T 6 0 の造成工程を示す。

第1-(1)表および第1-(2)表に本発明に用いる略号および該略号の説明を記す。

第 1-(1) 表

G l c	グルコース
G-6-P	グルコース-6-リン酸
G-1-P	グルコース-1-リン酸
G l c-1, 6-P 2	グルコース-1, 6-二リン酸
G a l	ガラクトース
G a l-1-P	ガラクトース-1-リン酸
G l c N-6-P	グルコサミン-6-リン酸
G l c N-1-P	グルコサミン-1-リン酸
G l c U A	グルクロン酸
G l c N	グルコサミン
G l c N A c	N-アセチルグルコサミン
G l c N A c-1-P	N-アセチルグルコサミン-1-リン酸
F-6-P	フルクトース-6-リン酸
F-1, 6-P 2	フルクトース-1, 6-二リン酸
M a n	マンノース
M a n-6-P	マンノース-6-リン酸
M a n-1-P	マンノース-1-リン酸
GDP-4-keto-6-deoxyMan	グアノシン-5'-二リン酸-4-ケト-6-デオキシマンノース
M a n N A c	N-アセチルマンノサミン
N e u A c	N-アセチルノイラミン酸
アセチルC o A	アセチルコエンザイムA
N T P	ヌクレオシド-5'-三リン酸
N D P	ヌクレオシド-5'-二リン酸
N M P	ヌクレオシド-5'-一リン酸
A T P	アデノシン-5'-三リン酸
U T P	ウリジン-5'-三リン酸
G T P	グアノシン-5'-三リン酸
C T P	シチジン-5'-三リン酸
G M P	グアノシン-5'-一リン酸

第 1-(2) 表

UDP-Glc	ウリジン-5'-二リン酸グルコース
UDP-Gal	ウリジン-5'-二リン酸ガラクトース
UDP-GlcNAc	ウリジン-5'-二リン酸N-アセチル グルコサミン
UDP-GalNAc	ウリジン-5'-二リン酸N-アセチル ガラクトサミン
UDP-GlcUA	ウリジン-5'-二リン酸グルクロン酸
GDP-Man	グアノシン-5'-二リン酸マンノース
GDP-Fuc	グアノシン-5'-二リン酸フコース
CMP-NeuAc	シチジン-5'-一リン酸N-アセチル ノイラミン酸
galU	グルコース-1-リン酸ウリジルトラン スフェラーゼ
ppa	(イノーガニック) ピロホスファターゼ
galK	ガラクトキナーゼ
galT	ガラクトース-1-リン酸ウリジルトラ ンスフェラーゼ
glmU	N-アセチルグルコサミン-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ グルコサミン-1-リン酸アセチルトランスフェラーゼ
pgm	ホスホグルコムターゼ
pfkB	ホスホフルクトキナーゼ
glmM	ホスホグルコサミンムターゼ
glk	グルコキナーゼ
manB	ホスホマンノムターゼ
manC	マンノース-1-リン酸グアニルトラン スフェラーゼ
gmd	GDP-マンノース-4,6-デヒドラターゼ
wcaG	GDP-4-ケト-6-デオキシマンノースエピ メラーゼ/レダクターゼ
neuA	CMP-N-アセチルノイラミン酸シンセ ターゼ
neuB	N-アセチルノイラミン酸シンターゼ
nanA	N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ
pyrG	シチジン-5'-三リン酸シンセターゼ
lgtB	β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ
lgtC	α 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ
ugd	UDP-グルコース デヒドロゲナーゼ

本発明によれば、1) NTPや糖リン酸等の高価な原料を必要とせず、オロット酸等の安価なヌクレオチドの前駆物質および糖のみを原料とする、2) NMPあるいはNDPからNTPへの転換において高価なホスホエノールピルビン酸とピルビン酸キナーゼの添加を必要としない、さらに、3) 酵素の単離操作を必要としない等の特徴を有する糖ヌクレオチドの新規な製造法および該糖ヌクレオチド製造法を利用した新規な複合糖質の製造法を提供できる。

本発明の製造法で製造される糖ヌクレオチドとしては、ヌクレオシド-5'-二リン酸残基の末端リン酸基と糖残基の還元基とがエステル結合をした一般構造を有する化合物をあげることができ、更に、ヌクレチド残基がシチジン-5'-一リン酸のもの、糖残基がポリオールのものも本発明により製造される糖ヌクレオチドに含まれる。

本発明の製造法で製造される複合糖質としては、単糖、オリゴサッカライド、担体等に結合した単糖またはオリゴサッカライド、蛋白質、ペプチド、脂質、糖蛋白質、糖脂質、グリコペプチドあるいはステロイド化合物等に糖質が結合した化合物をあげることができる。

以下に本発明を詳細に説明する。

1) 本発明で用いられるヌクレオチドの前駆物質からNTPを生産する能力を有する微生物としては、ヌクレオチドの前駆物質からNTPを生産する能力を有する微生物であればいずれも用いることができ、例えば、エシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物等をあげることができる。

エシェリヒア属に属する微生物としてはエシェリヒア・コリ等をあげることができる。

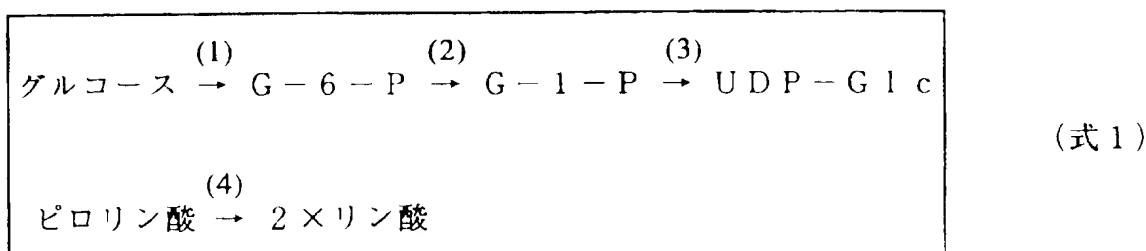
コリネバクテリウム属に属する微生物としてはコリネバクテリウム・アンモニアゲネス等をあげることができる。

2) 本発明で用いられる糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物としては、目的とする糖ヌクレオチドを生成する活性を有する生物であればいずれでも用いることができ、例えば、

2) -① UDP-Glc の生産に関しては、下記、式 1 に示した (1) から (4) の酵素活性の強い微生物を用いることが好ましい。

具体的には、エシェリヒア属に属する微生物およびコリネバクテリウム属に属する微生物をあげることができ、好ましい具体例としては、エシェリヒア・コリまたはコリネバクテリウム・アンモニアゲネスをあげることができる。

また、(1)、(2)、(3) および (4) から選ばれる一つ以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることもできる。該形質転換体の具体例として、エシェリヒア・コリ由来の galU および ppa 遺伝子を含む組換え体 DNA (pNT12) を保有するエシェリヒア・コリ KY8415 (FERM BP-408) 株等をあげることができる。



(1): ヘキソキナーゼ (EC 2.7.1.1) あるいはグルコキナーゼ (EC 2.7.1.2)

(2): ホスホグルコムターゼ (EC 2.7.5.1)

(3): グルコース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (EC 2.7.7.9)

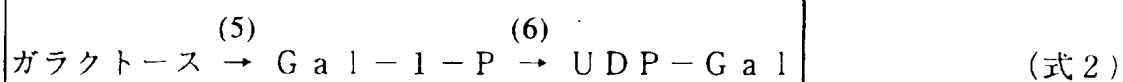
(4): (イノーガニック) ピロホスファターゼ (EC 3.6.1.1)

2) -② UDP-Gal の生産に関しては、下記、式 2 に示した (5) および (6) の酵素活性の強い微生物を、また、好ましくは、式 1 に示した (1) から (4) の酵素活性の強い性質をもあわせ持つような微生物を用いることが好ましい。

具体的には、エシェリヒア属に属する微生物およびコリネバクテリウム属に属する微生物をあげることができ、好ましい具体例としては、エシェリヒア・コリおよびコリネバクテリウム・アンモニアゲネスをあげることができる。

また、(5) および (6) から選ばれる一つ以上の酵素の活性を、あるいは、

(5) および (6) から選ばれる一つ以上の酵素と (1) から (4) から選ばれる一つ以上の酵素の活性を、遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることもできる。該形質転換体の具体例として、エシェリヒア・コリ由来の *galT* および *galK* 遺伝子を含む組換え体 DNA (pNT25) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株およびエシェリヒア・コリ由来の *galT* および *galK* 遺伝子を含む組換え体 DNA (pTK7) を保有するコリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 をあげることができる。



(5): ガラクトキナーゼ (EC 2.7.1.6)

(6): ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (EC 2.7.7.12)

2) -③ UDP-GlcNAc の生産に関しては、下記、式 3 に示した (7) から (12) および式 1 に示した (4) の酵素活性の強い微生物、あるいは式 3 に示した (13) および (10) の酵素活性の強い微生物を用いることが好ましい。

具体的には、エシェリヒア属およびコリネバクテリウム属に属する微生物をあげることができ、好ましい具体例としては、エシェリヒア・コリおよびコリネバクテリウム・アンモニアゲネスをあげることができる。

また、(4)、(7)、(8)、(9)、(10)、および (13) から選ばれる一つ以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることもできる。該形質転換体の具体例として、エシェリヒア・コリ由来の *glmM* 遺伝子を含む組換え体 DNA (pNT44) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株、エシェリヒア・コリ由来の *glmU* および *ppa* 遺伝子を含む組換え体 DNA (pNT14) を保有するエシェリヒア・コリ KY8415 株、エシェリヒア・コリ由来の *glk* 遺伝子を含む組換え体 DNA (pNT46) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株、エシェリヒア・コリ由来の *galK* 遺伝子を含む組

換え体DNA (pNT54) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株等をあげる
ことができる。

遺伝子組換えによる (8) のホスホグルコサミンムターゼ活性の発現および増
強には、Glc-1, 6-P2 の添加が必要とされるが[J. Biol. Chem., 271,
32 (1996)]、(11) および (12) の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増
強した形質転換株を用いることにより、Glc-1, 6-P2 を添加することな
く、G-6-P および F-6-P から Glc-1, 6-P2 を供給することが可
能である。

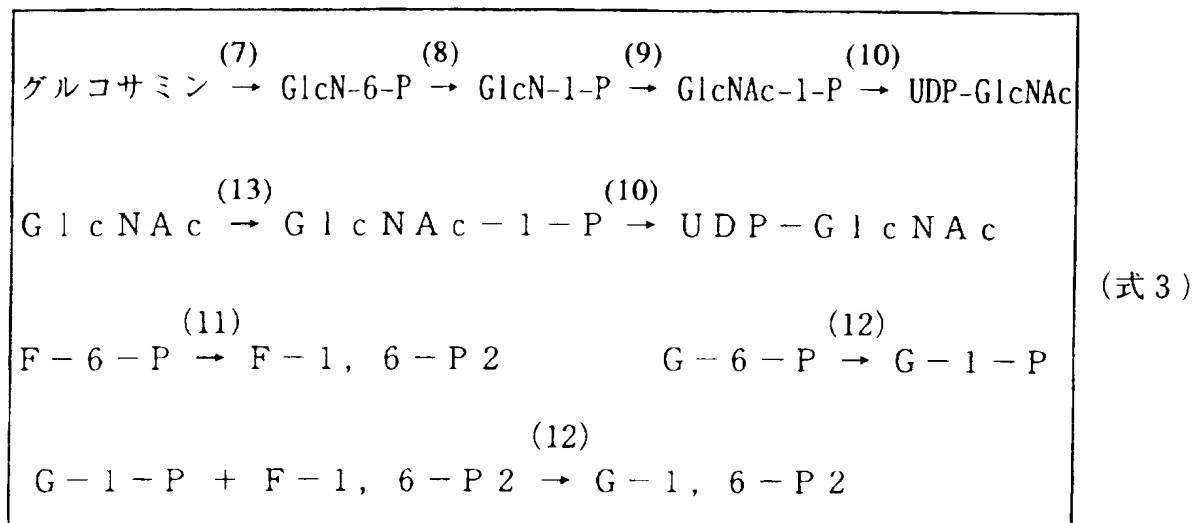
このような形質転換体の具体例として、エシェリヒア・コリ由来の pgm 遺伝
子を含む組換え体DNA (pNT24) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株、
エシェリヒア・コリ由来の pfkB 遺伝子を含む組換え体DNA (pNT47)
を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株、エシェリヒア・コリ由来の pgm およ
び pfkB 遺伝子を含む組換え体DNA (pNT55) を保有するエシェリヒ
ア・コリ NM522 株等をあげるすることができる。

(11) および (12) の酵素活性を用いて G-6-P および F-6-P から
Glc-1, 6-P2 を供給することにより、(8) のホスホグルコサミンムター
ゼ活性の発現を増強する方法は本発明で初めて開示された方法である。

(13) のガラクトキナーゼ (EC 2.7.1.6) を用い GlcNAc から GlcNAc
c-1-P を製造する方法は本発明で初めて開示された製造法である。該製造法
を用いて GlcNAc-c-1-P を製造することが可能である。即ち、ガラクトキ
ナーゼ活性の強い微生物、例えば、galK をコードする遺伝子を含む DNA 断
片とベクターとの組換え体DNA を保有する微生物の培養液または該培養液の処
理物を酵素源として用い、該酵素源および GlcNAc を水性媒体中に存在せし
め、該水性媒体中に GlcNAc-c-1-P を生成蓄積させ、該水性媒体中から G
lcNAc-c-1-P を採取することにより GlcNAc-c-1-P を製造すること
ができる。

水性媒体より、GlcNAc-c-1-P の採取は、活性炭やイオン交換樹脂等を

用いる通常の方法によって行うことができる。



(7):ヘキソキナーゼ(EC 2.7.1.1)あるいはグルコキナーゼ(EC 2.7.1.2)

(8):ホスホグルコサミンムターゼ

(9):グルコサミン-1-リン酸アセチルトランスフェラーゼ

(10):N-アセチルグルコサミン-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ
(EC 2.7.7.23)

(11):ホスホフルクトキナーゼ(EC 2.7.1.11)

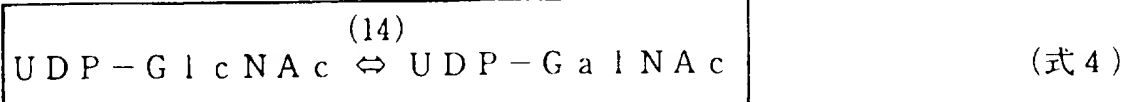
(12):ホスホグルコムターゼ(EC 2.7.5.1)

(13):ガラクトキナーゼ(EC 2.7.1.6)

2) -④ UDP-GalNAcの生産に関しては、式3に示した(7)から(12)、式4に示した(14)および式1に示した(4)の酵素活性の強い微生物、あるいは式3に示した(10)、(13)および式4に示した(14)の酵素活性の強い微生物を用いることが好ましい。

具体的には、エシェリヒア属およびコリネバクテリウム属に属する微生物をあげることができ、好ましい具体例としては、エシェリヒア・コリおよびコリネバクテリウム・アンモニアゲネスをあげることができる。

また、(7)から(14)および(4)から選ばれる一つ以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることもできる。

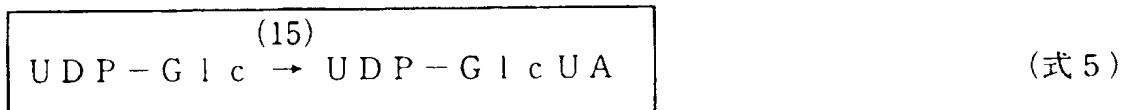


(14): UDP-GlcNAc 4-エピメラーゼ (EC 5.1.3.7)

2) -⑤ UDP-GlcUAの生産に関しては、式1に示した(1)から(4)および式5に示した(15)の酵素活性の強い微生物を用いることが好ましい。

具体的には、エシェリヒア属およびコリネバクテリウム属に属する微生物をあげることができ、好ましい具体例としては、エシェリヒア・コリおよびコリネバクテリウム・アンモニアゲネスをあげることができる。

また、(1)、(2)、(3)、(4)および(15)から選ばれる一つ以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることもできる。



(15): UDP-Glc デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.22)

2) -⑥ GDP-Manの生産に関しては、下記、式6に示した(16)から(18)および式3に示した(11)および(12)の酵素活性の強い微生物を用いることが好ましい。

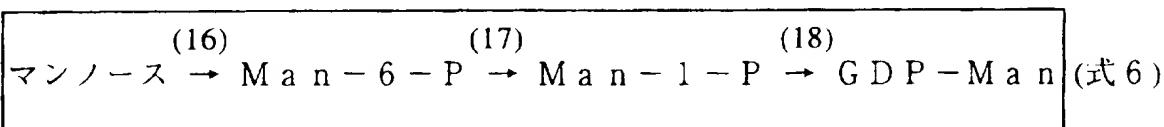
具体的には、エシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物をあげることができ、好ましい具体例としては、エシェリヒア・コリまたはコリネバクテリウム・アンモニアゲネスをあげることができる。

また、(16)、(17)および(18)から選ばれる一つ以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることもできる。該形質転換体の具体例として、エシェリヒア・コリ由来のmanBおよびmanC遺伝子

を含む組換え体DNA (pNK7) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株、エシェリヒア・コリ由来の glk 遺伝子を含む組換え体DNA (pNT46) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株等をあげることができる。

遺伝子組換え技術による (17) のホスホマンノムターゼ活性の発現および増強には、Glc-1, 6-P2 の添加が必要とされるが、(11) および (12) の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることにより、Glc-1, 6-P2 を添加することなく、G-6-P および F-6-P から Glc-1, 6-P2 を供給することが可能である。このような形質転換体の具体例として、エシェリヒア・コリ由来の pgm 遺伝子を含む組換え体DNA (pNT24) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株、エシェリヒア・コリ由来の pfkB 遺伝子を含む組換え体DNA (pNT47) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株、エシェリヒア・コリ由来の pgm および pfkB 遺伝子を含む組換え体DNA (pNT55) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株等をあげることができる。

(11) および (12) の酵素活性を用いて G-6-P および F-6-P から Glc-1, 6-P2 を供給することにより、(17) のホスホマンノムターゼ活性の発現を増強する方法は本発明で初めて開示された方法である。



(16):ヘキソキナーゼ(EC 2.7.1.1)あるいはグルコキナーゼ(EC 2.7.1.2)

(17):ホスホマンノムターゼ(EC 2.7.5.7)

(18):マンノース-1-リン酸グアニルトランスフェラーゼ(EC 2.7.7.13)

2) -⑦ GDP-Fuc の生産に関しては、下記、式7に示した (19) および (20) および式6に示した (16) から (18) および式3に示した (11) および (12) の酵素活性の強い微生物を用いることが好ましい。

具体的には、エシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物をあ

げることができ、好ましい具体例としては、エシェリヒア・コリまたはコリネバクテリウム・アンモニアゲネスをあげることができる。

また、(16)、(17)、(18)、(19)および(20)から選ばれる一つ以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることもできる。該形質転換体の具体例として、エシェリヒア・コリ由来の *manB* および *manC* 遺伝子を含む組換え体DNA (pNK7) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株、エシェリヒア・コリ由来の *gmd* および *wcaG* 遺伝子を含む組換え体DNA (pNK8) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株、エシェリヒア・コリ由来の *glk* 遺伝子を含む組換え体DNA (pNT46) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株等をあげることができる。

遺伝子組換え技術による(17)のホスホマンノムターゼ活性の発現および増強には、Glc-1, 6-P2の添加が必要とされるが、(11)および(12)の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることにより、Glc-1, 6-P2を添加することなく、G-6-PおよびF-6-PからGlc-1, 6-P2を供給することが可能である。

このような形質転換体の具体例として、エシェリヒア・コリ由来の *pgm* 遺伝子を含む組換え体DNA (pNT24) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株、エシェリヒア・コリ由来の *pfkB* 遺伝子を含む組換え体DNA (pNT47) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株、エシェリヒア・コリ由来の *pgm* および *pfkB* 遺伝子を含む組換え体DNA (pNT55) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株等をあげることができる。



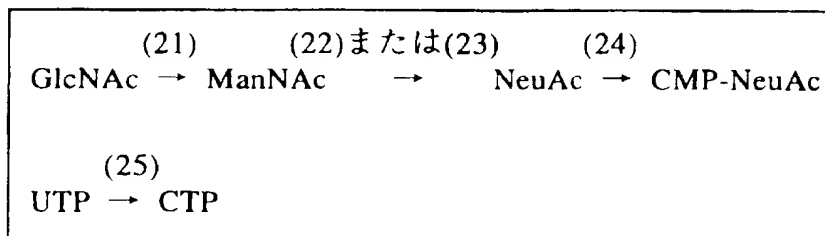
(19): GDP-Man-4,6-デヒドラターゼ (EC4.2.1.47)

(20): GDP-4-keto-6-deoxymannnose エピメラーゼ/レダクターゼ

2) -⑧ CMP-NeuAc の生産に関しては、下記、式 8 に示した (21)、(22) または (23)、(24) および (25) の酵素活性の強い微生物を用いることが好ましい。

具体的には、エシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物をあげることができ、好ましい具体例としては、エシェリヒア・コリまたはコリネバクテリウム・アンモニアゲネスをあげることができる。

また、(21)、(22)、(23)、(24) および (25) から選ばれる一つ以上の酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換株を用いることもできる。該形質転換体の具体例として、エシェリヒア・コリ由来の *nanA* 遺伝子を含む組換え体 DNA (pNAL1) を保有するエシェリヒア・コリ C600 株 [Appl. Environ. Microbiol., 51, 562 (1986)]、エシェリヒア・コリ由来の *neuA* 遺伝子を含む組換え体 DNA (pTA14) を保有するエシェリヒア・コリ NM522 株等をあげることができる。



(式 8)

(21):GlcNAc 2-エピメラーゼ (EC 5.1.3.8)

(22):NeuAc アルドラーゼ (EC 4.1.3.3)

(23):NeuAc シンセターゼ (EC 4.1.3.19)

(24):CMP-NeuAc シンセターゼ (EC 2.7.7.43)

(25):CTP シンセターゼ (EC 6.3.4.2)

微生物が 1) に記載の微生物の性質および 2) に記載の微生物の性質を同時に有する場合には、該微生物を利用し、ヌクレオチドの前駆物質と糖より糖ヌクレオチドを生産することが可能である。

微生物が 1) に記載の微生物の性質および 2) -①に記載の性質を同時に有す

る場合には、該微生物を利用し、オロット酸等のUTP前駆物質とグルコースよりUDP-Glcを、1)に記載の微生物の性質および2)-②に記載の微生物の性質を同時に有する場合には、該微生物を利用し、オロット酸等のUTP前駆物質とガラクトースよりUDP-Galを、1)に記載の微生物の性質および2)-③に記載の性質を同時に有する場合には該微生物を利用し、オロット酸等のUTP前駆物質とグルコサミンまたはN-アセチルグルコサミンよりUDP-GlcNAcを、1)に記載の微生物の性質および2)-④に記載の性質を同時に有する場合には該微生物を利用し、オロット酸等のUTP前駆物質とグルコサミンまたはN-アセチルグルコサミンよりUDP-GalNAcを、1)に記載の微生物の性質および2)-⑤に記載の性質を同時に有する場合には該微生物を利用し、オロット酸等のUTP前駆物質とグルコースよりUDP-GlcUAを、1)に記載の微生物の性質および2)-⑥に記載の性質を同時に有する場合には、該微生物を利用し、GMP等のGTP前駆物質とマンノースよりGDP-Manを、1)に記載の微生物の性質および2)-⑦に記載の性質を同時に有する場合には、該微生物を利用し、GMP等のGTP前駆物質とマンノースよりGDP-Fucを、1)に記載の微生物の性質および2)-⑧に記載の性質を同時に有する場合には、該微生物を利用し、オロット酸等のCTP前駆物質とN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルマンノサミンよりCMP-NeuAcを生産することが可能である。

このような微生物の具体例としては、エシェリヒア・コリ由来のgalTおよびgalK遺伝子を発現するコリネバクテリウム・アンモニアゲネスをあげることができる。

また、上記の菌株とは異なり、1菌株中に糖ヌクレオチドの製造に必要な活性の一部しか有していない微生物の場合、それぞれの活性を有する微生物を適宜組み合わせ、糖ヌクレオチドの製造を行うことができる。

1)に記載の性質を有する微生物も1種類である必要はなく、2種類以上で1)に記載する性質を構成する場合にも1)に記載の性質を有する微生物として

利用できる。具体的には、エシェリヒア・コリ由来の *pyrG* 遺伝子を発現するエシェリヒア・コリとコリネバクテリウム・アンモニアゲネスとの組み合わせを例示することができる（特開平 5-276974）。

同様に 2) に記載の性質を有する微生物も 1 種類である必要はなく、2 種類以上で構成することができる。該微生物群を適宜組み合わせることにより、目的とする糖ヌクレオチドを生産することができる。

例えば、1) に記載の性質を有する微生物および 2) -①に記載の性質を有する一種類以上の微生物を用い、オロット酸等の UTP 前駆物質とグルコースより UDP-Glc を、1) に記載の性質を有する微生物および 2) -②に記載の性質を有する一種類以上の微生物を用い、オロット酸等の UTP 前駆物質とガラクトースより UDP-Gal を、1) に記載の性質を有する微生物および 2) -③に記載の性質を有する一種類以上の微生物を用い、オロット酸等の UTP 前駆物質とグルコサミンまたは N-アセチルグルコサミンより UDP-GlcNAc を、1) に記載の性質を有する微生物および 2) -④に記載の性質を有する一種類以上の微生物を用い、オロット酸等の UTP 前駆物質とグルコサミンまたは N-アセチルグルコサミンより UDP-GalNAc を、1) に記載の性質を有する微生物および 2) -⑤に記載の性質を有する一種類以上の微生物を用い、オロット酸等の UTP 前駆物質とグルコースより UDP-GlcUA を、1) に記載の性質を有する微生物および 2) -⑥に記載の性質を有する一種類以上の微生物を用い、GMP 等の GTP 前駆物質とマンノースより GDP-Man を、1) に記載の性質を有する微生物および 2) -⑦に記載の性質を有する一種類以上の微生物を用い、GMP 等の GTP 前駆物質とマンノースより GDP-Fuc を、1) に記載の性質を有する微生物および 2) -⑧に記載の性質を有する一種類以上の微生物を用い、オロット酸等の CTP 前駆物質と N-アセチルグルコサミンまたは N-アセチルマンノサミンより CMP-NeuAc を生産することが可能である。

上述のように、糖ヌクレオチドの製造において、遺伝子組換え微生物を利用することが可能であるが、該製造に関与する、第 2 表に記載した遺伝子は、エシェ

リヒア・コリの染色体よりクローン化され、その全塩基配列が決定されている。

第 2 表

遺伝子	参考文献
g a l U 遺伝子	J. Biochem., <u>115</u> , 965 (1994)
p p a 遺伝子	J. Bacteriol., <u>170</u> , 5901 (1988)
g a l K 遺伝子	Nucleic Acids Res., <u>13</u> , 1841 (1985)
g a l T 遺伝子	Nucleic Acids Res., <u>14</u> , 7705 (1986)
g l m U 遺伝子	J. Bacteriol., <u>175</u> , 6150 (1993)
p g m 遺伝子	J. Bacteriol., <u>176</u> , 5847 (1994)
p f k B 遺伝子	Gene, <u>28</u> , 337 (1984)
g l m M 遺伝子	J. Biol. Chem., <u>271</u> , 32 (1996)
g l k 遺伝子	J. Bacteriol., <u>179</u> , 1298 (1997)
m a n B 遺伝子	J. Bacteriol., <u>178</u> , 4885 (1996)
m a n C 遺伝子	J. Bacteriol., <u>178</u> , 4885 (1996)
g m d 遺伝子	J. Bacteriol., <u>178</u> , 4885 (1996)
w c a G 遺伝子	J. Bacteriol., <u>178</u> , 4885 (1996)
n e u A 遺伝子	J. Biol. Chem., <u>264</u> , 14769 (1989)
n e u B 遺伝子	J. Bacteriol., <u>177</u> , 312 (1995)
n a n A 遺伝子	Nucleic Acids Res., <u>13</u> , 8843 (1985)
p y r G 遺伝子	J. Biol. Chem., <u>261</u> , 5568 (1986)
u g d 遺伝子	J. Bacteriol., <u>177</u> , 4562 (1995)

該遺伝子を含有するプラスミドを保有するエシェリヒア・コリからのプラスミド DNA の単離精製、プラスミド DNA の制限酵素による切断、切断した DNA 断片の単離精製、DNA 断片の酵素的結合、組換え体 DNA を用いたエシェリヒア・コリの形質転換等、遺伝子組換えに関する種々の操作は公知の方法 [例えば J. Sambrook らの成書; Molecular Cloning, A Laboratory Manual Second edition Cold Spring Harbor Laboratory (1989)] に準じて行うことができる。また ポリメラーゼ・チェイン・リアクション (以下、PCR と略す) はパーキン・エルマー・シータス社製のサーマル・サイクラー等を用いて行うことができる。

糖ヌクレオチドの製造に関与する遺伝子を宿主中で発現させるためには、該遺

伝子を含むDNA断片を、制限酵素類あるいはPCRで、該遺伝子を含む適当な長さのDNA断片とした後に、発現ベクター中プロモーターの下流に挿入し、次いで上記DNAを挿入した発現ベクターを、発現ベクターに適合した宿主中に導入することにより達成できる。

宿主としては、目的とする遺伝子を発現できるものは全て用いることができる。例えば、エシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュドモナス属、バチルス属、等に属する微生物の他、サッカロマイセス属、キャンディダ属等に属する酵母等をあげることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主に於いて自立複製可能なしは染色体中への組込みが可能で、糖ヌクレオチドの製造に関与する遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

上記の微生物を宿主として用いる場合は、糖ヌクレオチドの製造に関与する遺伝子の発現ベクターは微生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、糖ヌクレオチドの製造に関与する遺伝子、転写終結配列より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK+ (STRATAGENE社製)、pTrS30 [エシェリヒア・コリ JM109/pTrS30 (FERM BP-5407) より調製] および pTrS32 [エシェリヒア・コリ JM109/pTrS32 (FERM BP-5408) より調製]、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28（宝酒造社製）、pPA1（特開昭63-233798）、pCG11（特公平6-91827）等を例示することができる。

プロモーターとしては、上記の宿主中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、P_Lプロモータ

ー、 P_r プロモーター等の、エシェリヒア・コリやファージ等に由来するプロモーターをあげることができる。また *trp* プロモーターを2つ直列させたプロモーター、*tac* プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列としては、上記の宿主中で発現できるものであればいかなるものでもよいが、リボソーム結合配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

糖ヌクレオチドの製造に関与する遺伝子の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子の下流に転写終結配列を配置することが望ましい。

宿主としては、組換え体DNAが発現でき、糖ヌクレオチドの生成反応に利用できるものならいかなる微生物も使用でき、具体的には、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli KY8415、Escherichia coli NM522、Bacillus subtilis、Bacillus brevis、Bacillus amyloliquefacines、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium ammoniagenes ATCC21170、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas putida、Serratia marcescens 等をあげることができる。

酵母菌株を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YE p 13 (ATCC37115)、YE p 24 (ATCC37051)、YC p 50 (ATCC37419) 等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母菌株の宿主中で発現できるものであればいかなる

ものでもよい。例えば、ヘキシキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、*gal 1* プロモーター、*gal 10* プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、*MF α 1* プロモーター、*CUP 1* プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

宿主としては、組換え体DNAが発現でき、糖ヌクレオチドの生成反応に利用できるものならいかなる酵母も使用でき、具体的には、*Saccharomyces cerevisiae*、*Candida utilis*、*Candida parapsilosis*、*Candida krusei*、*Candida versatilis*、*Candida lipolytica*、*Candida zeylanoides*、*Candida guilliermondii*、*Candida albicans*、*Candida humicola*、*Pichia farinosa*、*Pichia ohmeri*、*Torulopsis candida*、*Torulopsis sphaerica*、*Torulopsis xylinus*、*Torulopsis famata*、*Torulopsis versatilis*、*Debaryomyces subglobosus*、*Debaryomyces cantarellii*、*Debaryomyces globosus*、*Debaryomyces hansenii*、*Debaryomyces japonicus*、*Zygosaccharomyces rouxii*、*Zygosaccharomyces bailii*、*Kluyveromyces lactis*、*Kluyveromyces marxianus*、*Hansenula anomala*、*Hansenula jadinii*、*Brettanomyces lambicus*、*Brettanomyces anomalus*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Trichosporon pullulans* および *Schwanniomyces alluvius* 等をあげることができる。

本発明に用いる微生物の培養は、通常の培養方法に従って行うことができる。該微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含むし、該微生物の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フルクトース、シュクロース、ラクトース、マルトース、マンニトール、ソルビトール、糖蜜、澱粉あるいは澱粉加水分解物等の炭水化物、ピルビン酸、乳酸、クエン酸、フマル酸等の各種有機酸、グルタミン酸、メチオニン、リジン等の各種アミノ酸、エタノール、プロパノール、グリセロール等のアルコール類が用いられる。また、白糖、キャッサバ、バガス、コーン・ステープ・リカー

等の天然有機栄養源も用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機および有機アンモニウム塩類、グルタミン酸、グルタミン、メチオニン等のアミノ酸、ペプトン、NZ アミン、コーン・ステープ・リカー、肉エキス、酵母エキス、麦芽エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕、大豆粕加水分解物、フィッシュミールあるいはその消化物等が用いられる。

無機物としては、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、硫酸亜鉛、炭酸カルシウム等が用いられる。ビタミン、アミノ酸、核酸等を必要に応じて添加してもよい。

培養は、振盪培養または通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は 15 ~ 45 °C がよく、培養時間は、通常 5 ~ 96 時間である。培養中 pH は、3.0 ~ 9.0 に保持する。pH の調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。また培養中必要に応じてアンピシリン、カナマイシンまたはクロラムフェニコール等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lac プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルー β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trp プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

本発明の糖ヌクレオチドの製造において、2 種以上の微生物を用いる場合、該微生物それぞれを個別に培養し、該培養液を利用して糖ヌクレオチドの製造に用いてもよいし、一つの培養器に同時に植菌し、混合培養した後、該培養液を利用

して糖ヌクレオチドの製造に用いてもよい。また、いずれかの微生物の培養中もしくは培養終了時に残りの微生物を植菌し、培養した後、該培養液を利用して糖ヌクレオチドの製造に用いてもよい。更に、上述1)に記載の性質を有する微生物と2)に記載の性質を有する微生物とを別々に培養し、各々の培養液を利用して糖ヌクレオチドの製造に用いてもよい。

該培養により得られた微生物の培養液および該培養液を種々処理した培養液の処理物を酵素源として用い、水性媒体中で糖ヌクレオチドの生成に用いることができる。

培養液の処理物としては、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる培養上清、該培養上清の濃縮物、培養上清から得られる酵素標品、培養液を遠心分離して得られる細胞（菌体を含む）、該細胞の乾燥物、該細胞の凍結乾燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の超音波処理物、該細胞の機械的摩砕処理物、該細胞の溶媒処理物、該細胞の酵素処理物、該細胞の蛋白質分画物、該細胞の固定化物あるいは該細胞より抽出して得られる酵素標品等を挙げることができる。

糖ヌクレオチドの生成において用いられる酵素源の量は、湿菌体として、1～500 g/lであり、好ましくは5～300 g/lである。また、同時に2種以上の微生物を用いて水性媒体中で反応を行う場合には、水性媒体中の該微生物の全湿菌体量は2～500 g/lであり、好ましくは5～400 g/lである。

糖ヌクレオチドの生成において用いられる水性媒体としては、水、リン酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ホウ酸塩、クエン酸塩、トリス等の緩衝液、メタノール、エタノール等のアルコール類、酢酸エチル等のエステル類、アセトン等のケトン類、アセトアミド等のアミド類等をあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。

糖ヌクレオチドの生成において用いられるヌクレオチドの前駆物質としては、オロット酸、ウラシル、オロチジン、ウリジン、シトシン、シチジン、アデニン、アデノシン、グアニン、グアノシン、ヒポキサンチン、イノシン、キサンチン、

キサントシン、イノシン-5'-リン酸、キサントシン-5'-リン酸、グアノシン-5'-リン酸、ウリジン-5'-リン酸およびシチジン-5'-リン酸等をあげることができ、好ましくはオロット酸およびグアノシン-5'-リン酸をあげることができる。該ヌクレオチドの前駆物質は、純品および該前駆物質の塩並びに夾雑物が反応を阻害しない限り、微生物により発酵生産された該前駆物質含有培養液および該培養液の該前駆物質粗精製物を用いることができる。ヌクレオチドの前駆物質は0.1 mM~1.0 M、好ましくは0.01~0.3 Mの濃度で用いられる。

糖ヌクレオチドの生成において用いられる糖としては、グルコース、フルクトース、ガラクトース、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、マンノース、フコース、N-アセチルマンノサミン、アセチルノイラミン酸およびこれらの誘導体等をあげることができる。該糖は、純品を用いてもよいし、これらを含むもので、夾雑物が反応を阻害しないものであればいずれも用いることができる。糖は、反応開始時に一括して添加しても良いし、あるいは反応中分割して、あるいは連続して添加することもでき、0.1 mM~2.0 Mの濃度で用いられる。

糖ヌクレオチドの生成において、必要に応じて、ATP再生に必要なエネルギー供与体、補酵素、リン酸イオン、マグネシウムイオン、フィチン酸等のキレート剤、界面活性剤および有機溶剤を添加してもよい。

エネルギー供与体としては、グルコース、フルクトース、シュクロース、ラクトース、マルトース、マンニトール、ソルビトール等の炭水化物、ピルビン酸、乳酸、酢酸等の有機酸、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等のアミノ酸、糖蜜、澱粉加水分解物等をあげることができ、1.0 mM~2.0 Mの濃度で用いられる。

リン酸イオンとしては、正リン酸、ピロリン酸、トリポリリン酸、テトラポリリン酸、ポリリン酸、メタリン酸、トリメタリン酸、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム等の無機リン酸塩等を

あげることができ、 $1.0 \text{ mM} \sim 1.0 \text{ M}$ の濃度で用いることができる。

マグネシウムイオンとしては、硫酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、塩化マグネシウム等の無機のマグネシウム塩、クエン酸マグネシウム等の有機のマグネシウム塩等をあげることができ、通常 $1 \sim 100 \text{ mM}$ の濃度で用いられる。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン等の非イオン系界面活性剤（例えばナイミーン S-215、日本油脂社製）、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド等のカチオン系界面活性剤（例えばカチオン F2-40E、日本油脂社製）、ラウロイル・ザルコシネート等のアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン等の三級アミン類（例えば三級アミン FB、日本油脂社製）等、各種糖ヌクレオチドの生成を促進するものであればいずれでも良く、1種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常 $0.1 \sim 50 \text{ g/l}$ の濃度で用いられる。

有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチル等が挙げられ、通常 $0.1 \sim 50 \text{ ml/l}$ の濃度で用いられる。

糖ヌクレオチドの生成反応は、水性媒体中、 $\text{pH } 5 \sim 10$ 、好ましくは $\text{pH } 6 \sim 9$ 、 $20 \sim 50^\circ\text{C}$ の条件で $2 \sim 96$ 時間行う。

該方法により糖ヌクレオチドを生成することができ、例えば、ウリジン二リン酸化合物、グアノシン二リン酸化合物およびシチジン一リン酸化合物等をあげることができる。具体的には、 UDP-Glc 、 UDP-Gal 、 UDP-GlcNAc 、 UDP-GalNAc 、 UDP-GlcUA 、 GDP-Man 、 GDP-Fuc 、 CMP-NeuAc およびこれらの誘導体から選ばれる糖ヌクレオチド等をあげることができる。

水性媒体中に生成した糖ヌクレオチドの定量は公知の方法に準じて行うことができ、例えば、 UDP-Glc と UDP-Gal の分離定量は Anal. Biochem., 216, 188 (1994)記載の高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLCと略す）による方法で行うことができる。また、 UDP-GlcNAc 、 GDP-Man 、 GDP-Fuc 、 CMP-NeuAc の分離定量は以下の条件のHPLCにより

行うことができる。

溶出液：0.1 M KH_2PO_4 (H_3PO_4 を用いて pH 3.2 に調整)

流速：1 ml/min

カラム：Partisil-10 SAX (ワットマン社製)

検出：UV 262 nm

定量：スタンダードの吸光度値の比較により算出

反応液中に生成した糖ヌクレオチドの採取は、活性炭やイオン交換樹脂等を用いる通常の方法によって行うことができ、例えば、UDP-Gal および UDP-Glc においては J. Org. Chem., 57, 152 (1992)、UDP-GlcNAc においては J. Org. Chem., 57, 146 (1992) に記載の方法に準じて行うことができる。

本発明の複合糖質の製造に用いることのできる微生物あるいは動物細胞あるいは昆虫細胞としては、糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物あるいは動物細胞あるいは昆虫細胞であればいずれも用いることができる。例えば、グルコシルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、グルクロノシルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよびフコシルトランスフェラーゼ等の活性を有する微生物あるいは動物細胞あるいは昆虫細胞をあげることができる。

また、前述の糖ヌクレオチドの製造の場合と同様に、遺伝子組換え技術により造成された微生物あるいは動物細胞あるいは昆虫細胞を利用することもできる。例えば、ヒト・メラノーマ細胞 SK-Mel-28 細胞由来のセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子を発現するエシェリヒア・コリ [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 4638 (1996)]、 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを産生するヒト・メラノーマ細胞 WM266-4 株 (ATCC CRL1676)、およびヒト・メラノーマ細胞

胞 WM266-4 由来 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を含有するナマルバ細胞 KJM-1 株等の組換え株 (特開平 6-181759)、ヒト HeLa 細胞由来の β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を発現するエシェリヒア・コリ [EMBO J., 9, 3171 (1990)] あるいは *Saccharomyces cerevisiae* [Biochem. Biophys. Res. Commun., 201, 160 (1994)]、ラット由来の β 1,6-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ遺伝子を発現する COS-7 細胞 (ATCC CRL1651) [J. Biol. Chem., 268, 15381 (1993)]、ヒト由来の N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ遺伝子を発現する Sf9 細胞 [J. Biochem., 118, 568 (1995)]、ヒト由来のグルクロノシルトランスフェラーゼを発現するエシェリヒア・コリ [Biochem. Biophys. Res. Commun., 196, 473 (1993)]、ヒト由来の α 1,3-フコシルトランスフェラーゼを発現するナマルバ細胞 [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)]、ヒト由来の α 1,3/1,4-フコシルトランスフェラーゼを発現する COS-1 細胞 [Genes Dev., 4, 1288 (1990)]、ヒト由来の α 1,2-フコシルトランスフェラーゼを発現する COS-1 細胞 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87, 6674 (1990)]、チキン由来の α 2,6-シアリルトランスフェラーゼを発現する COS-7 細胞 [Eur. J. Biochem., 219, 375 (1994)]、ヒト由来の α 2,8-シアリルトランスフェラーゼを発現する CHO 細胞 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91, 7952 (1994)]、ナイセリア由来の β 1,3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼあるいは β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼあるいは β 1,3-N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼあるいは α 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼを発現するエシェリヒア・コリ (W096/10086)、ナイセリア由来の α 2,3-シアリルトランスフェラーゼを発現するエシェリヒア・コリ [J. Biol. Chem., 271, 28271 (1996)]、ヘリコバクター・ピロリ由来の α 1,3-フコシルトランスフェラーゼを発現するエシェリヒア・コリ [J. Biol. Chem., 272, 21349 および 21357 (1997)]、酵母由来の α 1,2-マンノシルトランスフェラーゼを発現するエシェリヒア・コリ [J. Org. Chem., 58, 3985 (1993)] 等の微生物あるいは動物細胞あるいは昆虫細胞をあげるこ

ができる。

本発明の複合糖質の製造に微生物を用いる場合には、該微生物を、上記ヌクレオチドの前駆物質と糖から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養と同様の培地、培養条件により培養することができる。

本発明の複合糖質の製造に動物細胞を用いる場合には、該動物細胞を培養する培地として、一般に使用されているRPMI 1640培地、EagleのMEM培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、5%CO₂存在下等の条件下で行う。培養温度は20～40℃がよく、培養時間は、通常3～14日間である。また必要に応じて、抗生物質を培地に添加してもよい。

本発明の複合糖質の製造に昆虫細胞を用いる場合には、該昆虫細胞の培養を公知の方法[J. Biol. Chem., 268, 12609 (1993)]に準じて行うことができる。

該培養により得られた微生物あるは動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液および該培養液を種々処理した培養液の処理物を酵素源として用い、水性媒体中で複合糖質の生成に用いることができる。培養液の処理物としては、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる培養上清、該培養上清の濃縮物、培養上清から得られる酵素標品、培養液を遠心分離して得られる細胞（菌体を含む）、該細胞の乾燥物、該細胞の凍結乾燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の超音波処理物、該細胞の機械的摩砕処理物、該細胞の溶媒処理物、該細胞の酵素処理物、該細胞の蛋白質分画物、該細胞の固定化物あるいは該細胞より抽出して得られる酵素標品等を挙げることができる。

複合糖質の生成において用いられる酵素源の量は、酵素の活性を、37℃で1分間に1 μ moleの複合糖質を生成することのできる活性を1単位（U）として、0.1 mU/l～10000 U/lであり、好ましくは1 mU/l～1000 U/lの濃度で用いることができる。

複合糖質の生成において用いられる水性媒体としては、水、リン酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ホウ酸塩、クエン酸塩、トリス等の緩衝液、メタノール、エタノール等

のアルコール類、酢酸エチル等のエステル類、アセトン等のケトン類、アセトアミド等のアミド類等をあげることができる。また、酵素源として用いた微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液を水性媒体として用いることができる。

複合糖質の生成において、必要に応じて、フィチン酸等のキレート剤、 $MnCl_2$ 等の無機塩、 β -メルカプトエタノール等を添加することができる。

複合糖質の生成において用いられる糖ヌクレオチドとしては、上記糖ヌクレオチドの生成で得られた反応液あるいは該反応液から精製した糖ヌクレオチドを用いることができ、 $0.01\text{ mM} \sim 2.0\text{ M}$ の濃度で用いることができる。

また、複合糖質の生成反応液中で、上述の方法により糖ヌクレオチドを生成させることにより、糖ヌクレオチドを供給することもできる。

複合糖質の生成において用いられる複合糖質前駆物質としては、単糖、オリゴサッカライド、担体等に結合した単糖およびオリゴサッカライド、蛋白質、ペプチド、脂質、糖蛋白質、糖脂質、グリコペプチドあるいはステロイド化合物等糖転移酵素の基質となるものであればいかなるものでも用いることができる。

具体的にはグルコース、ガラクトース、マンノース、シアル酸、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、ラクトース、N-アセチルラクトサミン、ラクト-N-ビオース、 $GlcNAc\beta 1-3Gal\beta 1-4Glc$ 、 $GlcNAc\beta 1-4Gal\beta 1-4Glc$ 、グロボトリオース、 $Gal\alpha 1-4Gal\beta 1-4GlcNAc$ 、2'-フコシルラクトース、3-フコシルラクトース、3'-シアリルラクトース、6'-シアリルラクトース、3'-シアリル-N-アセチルラクトサミン、6'-シアリル-N-アセチルラクトサミン、シアリルラクト-N-ビオース、ルイスX、ルイスa、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-ネオテトラオース、ラクトジフコテトラオース、3'-シアリル-3-フコシルラクトース、シアリルルイスX、シアリルルイスa、ラクト-N-フコペンタオースI、ラクト-N-フコペンタオースII、ラクト-N-フコペンタオースIII、ラクト-N-フコペンタオースV、LS-テトラサッカライドa、LS-テトラサッカライドb、LS-テトラサッカライドc、 $(\alpha 2, 3)$ シアリルラクト-N-ネオテトラオースおよびこ

これらの誘導体、セリン、スレオニン、アスパラギンおよび該アミノ酸を含有するペプチドおよびその誘導体、セラミドおよびその誘導体等を例示することができる。該複合糖質前駆物質は0.01 mM～2.0 Mの濃度で用いることができる。

本発明の複合糖質としては、グルコース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、グルクロン酸、マンノース、N-アセチルマンノサミン、フコース、シアル酸、ラクトース、N-アセチルラクトサミン、ラクト-N-ビオース、GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc、GlcNAc β 1-4 Gal β 1-4 Glc、グロボトリオース、Gal α 1-4 Gal β 1-4 GlcNAc、2'-フコシルラクトース、3-フコシルラクトース、3'-シアリルラクトース、6'-シアリルラクトース、3'-シアリル-N-アセチルラクトサミン、6'-シアリル-N-アセチルラクトサミン、シアリルラクト-N-ビオース、ルイスX、ルイスa、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-ネオテトラオース、ラクトジフコテトラオース、3'-シアリル3-フコシルラクトース、シアリルルイスX、シアリルルイスa、ラクト-N-フコペンタオースI、ラクト-N-フコペンタオースII、ラクト-N-フコペンタオースIII、ラクト-N-フコペンタオースV、LS-テトラサッカライドa、LS-テトラサッカライドb、LS-テトラサッカライドc、(α 2, 3)シアリルラクト-N-ネオテトラオース、ラクト-N-ジフコヘキサオースI、ラクト-N-ジフコヘキサオースII、ラクト-N-ヘキサオース、ラクト-N-ネオヘキサオース、ジシアリルラクト-N-テトラオースおよびこれらの誘導体から選ばれる糖を1あるいはそれ以上含有する複合糖質または該複合糖質を含む複合糖質をあげることができ、例えば、Gal β 1-3 Glc、Gal β 1-4 Glc、Gal β 1-3 GlcNAc、Gal β 1-4 GlcNAc、Gal β 1-3 Gal、Gal β 1-4 Gal、Gal β 1-3 GalNAc、Gal β 1-4 GalNAc、Gal α 1-3 Glc、Gal α 1-4 Glc、Gal α 1-3 GlcNAc、Gal α 1-4 GlcNAc、Gal α 1-3 Gal、Gal α 1-4 Gal、Gal α 1-3 GalNAc、Gal α 1-4 GalNAc、GlcNAc β 1-3 Gal、GlcNAc β 1-4 Gal、GlcNAc β 1-6 Gal、

GlcNAc β 1-3 Glc、GlcNAc β 1-4 Glc、GlcNAc β 1-3 GlcNAc、GlcNAc β 1-4 GlcNAc、GlcNAc β 1-6 GalNAc、GlcNAc β 1-2 Man、GlcNAc β 1-4 Man、GlcNAc β 1-6 Man、GalNAc β 1-3 Gal、GalNAc β 1-4 Gal、GalNAc β 1-4 GlcNAc、GalNAc α 1-3 GalNAc、Man β 1-4 GlcNAc、Man α 1-6 Man、Man α 1-3 Man、Man α 1-2 Man、GlcUA β 1-4 GlcN、GlcUA β 1-3 Gal、GlcUA β 1-3 GlcNAc、GlcUA β 1-3 GalNAc、NeuAc α 2-3 Gal、NeuAc α 2-6 Gal、NeuAc α 2-3 GlcNAc、NeuAc α 2-6 GlcNAc、NeuAc α 2-3 GalNAc、NeuAc α 2-6 GalNAc、NeuAc α 2-8 NeuAc、Fuc α 1-3 Glc、Fuc α 1-4 Glc、Fuc α 1-3 GlcNAc、Fuc α 1-4 GlcNAc、Fuc α 1-2 GalおよびFuc α 1-6 GlcNAcから選ばれる結合を有する糖を含む複合糖質または該複合糖質を含む複合糖質をあげることができる。また、該糖を有する複合糖質に含まれる糖の数としては、10個以下あるいは6個以下のものをあげることができる。

具体的な複合糖質製造法としては、

(1) ナイセリア由来の β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (W096/10086) を発現する微生物、UTPの前駆物質からUTPを生産する能力を有する微生物、糖とUTPからUDP-Galを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロット酸とガラクトースとグルコースからラクトースを生成させることができる。

(2) ナイセリア由来の β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (W096/10086) を発現する微生物、UTPの前駆物質からUTPを生産する能力を有する微生物、糖とUTPからUDP-Galを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロット酸とガラクトースとN-アセチルグルコサミンからN-アセチルラクトサミンを生成させることができる。

(3) ナイセリア由来の α 2,3-シアリルトランスフェラーゼ [J. Biol. Chem., 271, 28271 (1996)] を発現する微生物、CTPの前駆物質からCTPを生産する能力を有する微生物、糖とCTPからCMP-NeuAcを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロット酸とN-アセチルマンノサミンとピルビン酸とラクトースから3'-シアリルラクトースを生成させることができる。

(4) ナイセリア由来の α 2,3-シアリルトランスフェラーゼ [J. Biol. Chem., 271, 28271 (1996)] を発現する微生物、CTPの前駆物質からCTPを生産する能力を有する微生物、糖とCTPからCMP-NeuAcを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロット酸とN-アセチルマンノサミンとピルビン酸とN-アセチルラクトサミンから3'-シアリル-N-アセチルラクトサミンを生成させることができる。

(5) チキン由来の α 2,6-シアリルトランスフェラーゼを発現するCOS-7細胞 [Eur. J. Biochem., 219, 375 (1994)]、CTPの前駆物質からCTPを生産する能力を有する微生物、糖とCTPからCMP-NeuAcを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロット酸とN-アセチルマンノサミンとピルビン酸とN-アセチルラクトサミンから6'-シアリル-N-アセチルラクトサミンを生成させることができる。

(6) ナイセリア由来の β 1,3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (W096/10086) を発現する微生物、UTPの前駆物質からUTPを生産する能力を有する微生物、糖とUTPからUDP-GlcNAcを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロット酸とN-アセチルグルコサミンとラクトースからGlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glcを生成させることができる。

(7) β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼを産生するヒト・メラノーマ細胞

WM266-4 株 (ATCC CRL1676)、あるいはヒト・メラノーマ細胞 WM266-4 由来 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を発現するナマルバ細胞 KJM-1 株等の組換え株 (特開平 6-181759)、UTP の前駆物質から UTP を生産する能力を有する微生物、糖と UTP から UDP-Gal を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロット酸とガラクトースと GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc からラクト-N-テトラオースを生成させることができる。

(8) ヒト HeLa 細胞由来の β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を発現するエシェリヒア・コリ [EMBO J., 9, 3171 (1990)] あるいは *Saccharomyces cerevisiae* [Biochem. Biophys. Res. Commun., 201, 160 (1994)]、UTP の前駆物質から UTP を生産する能力を有する微生物、糖と UTP から UDP-Gal を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロット酸とガラクトースと GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc からラクト-N-ネオテトラオースを生成させることができる。

(9) ナイセリア由来の β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (W096/10086) を発現する微生物、UTP の前駆物質から UTP を生産する能力を有する微生物、糖と UTP から UDP-Gal を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロット酸とガラクトースと GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc からラクト-N-ネオテトラオースを生成させることができる。

(10) ナイセリア由来の β 1,3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ (W096/10086) を発現する微生物、ナイセリア由来の β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (W096/10086) を発現する微生物、UTP の前駆物質から UTP を生産する能力を有する微生物、糖と UTP から UDP-GlcNAc を生産する能力を有する微生物、糖と UTP から UDP-Gal を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことに

より、オロット酸とN-アセチルグルコサミンとガラクトースとラクトースからラクト-N-ネオテトラオースを生成させることができる。

(11) ナイセリア由来の α 2,3-シアリルトランスフェラーゼ [J. Biol. Chem., 271, 28271 (1996)] を発現する微生物、CTPの前駆物質からCTPを生産する能力を有する微生物、糖とCTPからCMP-NeuAcを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロット酸とN-アセチルマンノサミンとピルビン酸とラクト-N-ネオテトラオースから (α 2, 3) シアリルラクト-N-ネオテトラオースを生成させることができる。

(12) ヒト由来の α 1,3-フコシルトランスフェラーゼを発現するナマルバ細胞 [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)]、GTPの前駆物質からGTPを生産する能力を有する微生物、糖とGTPからGDP-Fucを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、GMPとマンノースとラクト-N-ネオテトラオースからラクト-N-フコペンタオース III を生成させることができる。

(13) ヘリコバクター・ピロリ由来の α 1,3-フコシルトランスフェラーゼ [J. Biol. Chem., 272, 21349 および 21357 (1997)] を発現する微生物、GTPの前駆物質からGTPを生産する能力を有する微生物、糖とGTPからGDP-Fucを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、GMPとマンノースとラクト-N-ネオテトラオースからラクト-N-フコペンタオース III を生成させることができる。

(14) ナイセリア由来の α 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ

(W096/10086) を発現する微生物、UTPの前駆物質からUTPを生産する能力を有する微生物、糖とUTPからUDP-Galを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロット酸とガラクトースとラクトースからグロボトリオースを生成させることができる。

(15) ナイセリア由来の β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ

(W096/10086) を発現する微生物、ナイセリア由来の α 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (W096/10086) を発現する微生物、UTP の前駆物質から UTP を生産する能力を有する微生物、糖と UTP から UDP-Gal を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロット酸とガラクトースとグルコースからグロボトリオースを生成させることができる。

(16) ナイセリア由来の α 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ

(W096/10086) を発現する微生物、UTP の前駆物質から UTP を生産する能力を有する微生物、糖と UTP から UDP-Gal を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロット酸とガラクトースと N-アセチルラクトサミンから Gal α 1-4 Gal β 1-4 GlcNAc を生成させることができる。

(17) ヒト由来の β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ (特開平 6-181759) を発現する動物細胞、UTP の前駆物質から UTP を生産する能力を有する微生物、糖と UTP から UDP-Gal を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロット酸とガラクトースと N-アセチルグルコサミンからラクト-N-ビオースを生成させることができる。

(18) ナイセリア由来の α 2,3-シアリルトランスフェラーゼ [J. Biol. Chem., 271, 28271 (1996)] を発現する微生物、CTP の前駆物質から CTP を生産する能力を有する微生物、糖と CTP から CMP-NeuAc を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、オロット酸と N-アセチルマンノサミンとピルビン酸とラクト-N-ビオースからシアリルラクト-N-ビオースを生成させることができる。

(19) ヒト由来の α 1,3-フコシルトランスフェラーゼ [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)] を発現する動物細胞、GTP の前駆物質から GTP を生産する能

力を有する微生物、糖とGTPからGDP-Fucを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、GMPとマンノースと3'-シアリルN-アセチラクトサミンからシアリルルイスXを生成させることができる。

(20) ヒト由来の α 1,3/1,4-フコシルトランスフェラーゼ [Carbohydrate Research, 190, 1 (1989)]、GTPの前駆物質からGTPを生産する能力を有する微生物、糖とGTPからGDP-Fucを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、GMPとマンノースとシアリルラクト-N-ビオースからシアリルルイスaを生成させることができる。

(21) 酵母由来の α 1,2-マンノシルトランスフェラーゼを発現するエシェリヒア・コリ [J. Org. Chem., 58, 3985 (1993)]、GTPの前駆物質からGTPを生産する能力を有する微生物、糖とGTPからGDP-Manを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物とを酵素源とした酵素反応を行うことにより、GMPとマンノースからMan α 1-2Manを生成させることができる。

等をあげることができる。

複合糖質の製造法は、上記に記載された例に限定されるものではなく、本特許に記載された糖ヌクレオチド製造法と組み合わせることができる糖転移酵素、および該酵素が許容する基質特異性の範囲において、どのような糖鎖でも、ヌクレオチドの前駆物質、糖、複合糖質前駆物質のみを原料として工業的に製造することが可能である。

本発明の製造方法により製造される複合糖質として、例えば、

(1) 病原性微生物やウィルスの感染に関与する複合糖質類、例えば、病原性微生物やウィルスの受容体として認識される複合糖質類、

(2) 病原性微生物やウィルスが生産する毒素の受容体として認識される複合糖質類、

(3) 生体内で、細胞接着、異物の認識、各種リンフォカインの結合等に関与する複合糖質類、

等の、グルコース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、グルクロン酸、マンノース、N-アセチルマンノサミン、フコース、シアル酸等の糖を、単独あるいは複数、化学的に許容される結合形式で含有する複合糖質をあげることができ、より具体的には、

(1) ヒトや動物のミルク中に含有される乳幼児の微生物感染防御に関与する複合糖質類、例えば、ラクトーN-テトラオース、ラクトーN-ネオテトラオース等の複合糖質、

(2) Escherichia coli、Propionibacterium granulosum、Mycobacterium tuberculosis、Moraxella catarrhalis、Candida albicans、Staphylococcus saprophyticus、Streptococcus pneumoniae、Streptococcus agalactiae、Pseudomonas aeruginosa、Actinomyces naeslundii、Neisseria gonorrhoeae、Helicobacter pylori、Haemophilus influenzae等の微生物を認識する受容体複合糖質、

(3) インフルエンザウイルス、コロナウイルス、センダイウイルス、ニューカッスル病ウイルス、レオウイルス、ロタウイルス、エイズウイルス、等のウイルスの受容体複合糖質、

(4) クリプトスポリジウム、トリパノゾーマなどの原虫の受容体複合糖質

(5) コレラ毒素、大腸菌易熱性毒素、ボツリヌス毒素、クロストリジウム δ 毒素、クロストリジウムA毒素、志賀毒素、ペロ毒素、志賀毒素様毒素、腸炎ビブリオ耐熱性毒素、破傷風毒素、等の毒素が結合する受容体複合糖質、

(6) GD3、GM3等のガングリオシドやグロボ系糖脂質等の、ガン関連複合糖質、

(7) シアリルルイスx糖鎖等の、白血球の炎症部位への接着や機能修飾に関与する複合糖質類、

(8) 慢性関節リュウマチやIgA腎症等の自己免疫疾患に関与する複合糖質類、

(9) 異物認識やガン細胞の認識に関与する各種のレクチン様物質が認識する複合糖質類等をあげることができる。

水性媒体中に生成した複合糖質の定量は公知の方法に準じて行うことができる。

[Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85, 3289 (1988)、Anal. Biochem., 174, 459 (1988)]。

反応液中に生成した複合糖質の採取は、活性炭やイオン交換樹脂等を用いる通常の方法によって行うことができ、例えば、N-アセチルラクタサミンにおいては J. Org. Chem., 47, 5416 (1982) 記載の方法に準じて行うことができる。

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

以下に本発明の実施例を示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例 1. g a l U、p p a を発現する組換え体プラスミドの造成

g a l U、p p a を発現する組換え体プラスミド p N T 1 2 の造成方法について以下に述べる (図 1、図 2)。

1) P_L プロモーターを含む発現ベクターの造成

P_L プロモーターを含む発現ベクターである p P A 3 1 および p P A C 3 1 は以下に示す方法で造成した (図 1)。

トリプトファンプロモーターを含むプラスミド p T r S 3 0 を保有するエシェリヒア・コリ JM109/pTrS30 (FERM BP-5407) および P_L プロモーターを含むプラスミド p P A 1 (特開昭 63-233798)、 P_L プロモーターおよび c I 8 5 7 リプレッサーを含むプラスミド p P A C 1 (FERM BP-6054) を保有するエシェリヒア・コリを、それぞれ LB 培地 [バクトトリプトン (ディフコ社製) 10 g/l、酵母エキス (ディフコ社製) 5 g/l、NaCl 5 g/l、pH を 7.2] に植菌し、30℃で18時間培養した。

該培養により得られた菌体から前述の公知の方法により、p T r S 3 0、p P

A1およびpPAC1プラスミドDNAを単離精製した。

精製したpTrS30 DNA 0.2 μ gを制限酵素Pst IおよびCla Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、ジーンクリーンIIキット (Bio101社製) により3.4 kbの断片を回収した。精製したpPA1 DNA 0.5 μ gを制限酵素Pst IおよびCla Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に1.0 kbの断片を回収した。

該3.4 kbの断片および1.0 kbの断片をライゲーションキット (TAKARA ligation Kit、宝酒造社製) を用いて、16℃で16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、P_Lプロモーターによる発現ベクターであるpPA31を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (第1図)。

精製したpPA31 DNA 0.2 μ gを制限酵素Pst IおよびCla Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、ジーンクリーンIIキットにより3.4 kbの断片を回収した。精製したpPAC1 DNA 0.5 μ gを制限酵素Pst IおよびCla Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に2.3 kbの断片を回収した。

該3.4 kbの断片および2.3 kbの断片をライゲーションキットを用いて、16℃で16時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、37℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、cI857リプレッサーを含むP_Lプロモーターによる発現ベクター

である p P A C 3 1 を取得した。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第 1 図）。

2) g a l U 発現プラスミドの造成

エシェリヒア・コリ W3110 株の染色体 DNA を公知の方法 [例えば Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons Inc. (1994)] により単離精製した。

配列番号 1 記載のセンス鎖 DNA プライマーと、配列番号 2 記載のアンチセンス鎖 DNA プライマーをアプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 社製 3 8 0 A ・ DNA 合成機を用いて合成した。

該合成 DNA をプライマーとして、W3110 株の染色体 DNA を鋳型として P C R を行った。P C R は W3110 染色体 DNA 0. 0 4 μ g、プライマー各 0. 5 μ M、T A K A R A E x T a q (宝酒造社製) 1. 0 u n i t、1 0 \times E x T a q 緩衝液 (宝酒造社製) 4 μ l、deoxy N T P 各 2 0 0 μ M を含む反応液 4 0 μ l を用い、9 4 $^{\circ}$ C—1 分、4 2 $^{\circ}$ C—2 分、7 2 $^{\circ}$ C—3 分の工程を 3 0 回繰り返すことにより行った。

該反応液の 1 / 1 0 量をアガロースゲル電気泳動にかけ、目的の断片が増幅されていることを確認後、残りの反応液と等量の T E [1 0 m M トリス塩酸緩衝液 (p H 8. 0)、1 m M E D T A] 飽和フェノール/クロロホルム (1 v o l / 1 v o l) を添加し、混合した。該混合液を遠心分離後、得られた上層に 2 倍容量の冷エタノールを加えて混合し、- 8 0 $^{\circ}$ C に 3 0 分放置した。該放置液を遠心分離し DNA の沈殿を得た。該沈殿を 7 0 % 冷エタノールで洗浄し、真空乾燥して沈殿を得た。以後、T E 飽和フェノール/クロロホルムを添加し、エタノールで洗浄した DNA の沈殿を得るまでの操作をエタノール沈殿法と呼ぶ。

該 DNA の沈殿を 2 0 μ l の T E に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 H i n d III および B a m H I で切断し、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離した後、ジーンクリーン II キットにより 0. 9 k b の断片を回収した。実施例 1 - 1) で取得した p P A 3 1 DNA 0. 2 μ g を制限酵素

H i n d IIIおよびB a m H Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に4.2 kbの断片を回収した。

該0.9 kbの断片および4.2 kbの断片をライゲーションキットを用いて16℃で16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ KY8415 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μg/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、galU発現プラスミドであるpNT9を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第2図)。

3) galU, ppa同時発現プラスミドの造成

配列番号3記載のセンス鎖DNAプライマーと、配列番号4記載のアンチセンス鎖DNAプライマーを合成し、該合成DNAをプライマーとして、W3110株の染色体DNAを鋳型として前述と同一の条件でPCRを行った。

PCR終了後、エタノール沈殿法により、DNAの沈殿を取得した。該沈殿を20 μlのTEに溶解した。該溶解液5 μlを用い、DNAを制限酵素B a m H IおよびS a l Iで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキットにより1.0 kbの断片を回収した。実施例1-2)で取得したpNT9 DNA 0.2 μgを制限酵素B a m H IおよびS a l Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に4.9 kbの断片を回収した。

該1.0 kbの断片および4.9 kbの断片をライゲーションキットを用いて16℃で16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ KY8415 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μg/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミド

を抽出し、*galU*, *ppa* 同時発現プラスミドである *pNT12* を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第2図）。

該 *pNT12* DNA 0.5 μ g を制限酵素 *EcoRI* および *SalI* で切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離しジーンクリーンIIキットにより2.2 kbの断片を回収した。一方、*pSTV28* DNA（宝酒造社製）0.2 μ g を制限酵素 *EcoRI* および *SalI* で切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に3.0 kbの断片を回収した。

該2.2 kbの断片および3.0 kbの断片をライゲーションキットを用いて16℃で16時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をクロラムフェニコール 10 μ g/ml を含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、*galU*, *ppa* 遺伝子発現プラスミドである *pNT32* を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（図2）。

実施例2. UDP-Glcの生産

実施例1で得たエシェリヒア・コリ KY8415/*pNT12* 株を、アンピシリン 50 μ g/ml を含むLB培地 125 ml の入った1 L容バッフル付き三角フラスコに接種し、30℃で220 rpmの条件で17時間培養した。該培養液 125 ml をグルコース 10 g/l、バクトトリプトン（ディフコ社製）12 g/l、酵母エキス（ディフコ社製）24 g/l、 KH_2PO_4 2.3 g/l（別殺菌）、 K_2HPO_4 12.5 g/l（別殺菌）、アンピシリン 50 μ g/ml の組成からなる液体培地（pH無調整）2.5 Lの入った5 L容培養槽に接種し、30℃で4時間、更に、40℃で3時間、600 rpm、通気量 2.5 L/分の条件で培養を行った。

該培養中、28%アンモニア水を用いて、培養液のpHを7.0に維持した。また、培養途中で必要に応じてグルコースを添加した。該培養液を遠心分離し、

湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株を、グルコース 50 g/l 、ポリペプトン（日本製薬社製） 10 g/l 、酵母エキス（オリエンタル酵母社製） 10 g/l 、尿素 5 g/l 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/l 、 KH_2PO_4 1 g/l 、 K_2HPO_4 3 g/l 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/l 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/l 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l 、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/l 、L-システイン 20 mg/l 、D-パントテン酸カルシウム 10 mg/l 、ビタミンB1 5 mg/l 、ニコチン酸 5 mg/l 、およびビオチン $30\text{ }\mu\text{g/l}$ （ 10 N NaOH で $\text{pH}7.2$ に調整）の組成からなる液体培地 20 ml の入った 300 ml 容バッフル付き三角フラスコに接種し、 28°C で 220 rpm の条件で、 24 時間培養した。

該培養液 20 ml を上記と同一組成の液体培地 250 ml の入った 2 L 容バッフル付き三角フラスコに接種し、 28°C で 220 rpm の条件で、 24 時間培養した。得られた培養液を種培養液として用いた。

該種培養液 250 ml を、グルコース 150 g/l 、肉エキス（極東製薬社製） 5 g/l 、 KH_2PO_4 10 g/l 、 K_2HPO_4 10 g/l 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g/l 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/l 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/l 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l 、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/l （別殺菌）、 β -アラニン 15 mg/l （別殺菌）、L-システイン 20 mg/l 、ビオチン $100\text{ }\mu\text{g/l}$ 、尿素 2 g/l 、およびビタミンB1 5 mg/l （別殺菌）（ 10 N NaOH で $\text{pH}7.2$ に調整）の組成からなる液体培地 2.25 L の入った 5 L 容培養槽に接種し、 32°C で 600 rpm 、通気量 2.5 L/min の条件で 24 時間培養を行った。培養中、 28% アンモニア水を用いて、培養液の pH を 6.8 に維持した。

該培養液を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C

で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシェリヒア・コリ KY8415/pNT12 株湿菌体 40 g/l、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株湿菌体 150 g/l、グルコース 100 g/l、 KH_2PO_4 20 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、オロット酸（カリウム塩）21.2 g/l、ナイミーン S-2154 g/l、キシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌（900 rpm）し、32℃で21時間反応を行った。

反応中、4N NaOHを用いて、該反応液のpHを7.2に維持し、必要に応じてグルコース、 KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に43.9 g/lのUDP-Glc（2Na塩）が生成した。

実施例3. galT、galKを発現する組換え体プラスミドの造成

galT、galKを発現する組換え体プラスミドpNT25の造成方法について以下に述べる（第3図）。

配列番号5記載のセンス鎖DNAプライマーと、配列番号6記載のアンチセンス鎖DNAプライマーを合成し、該合成DNAをプライマーとして、W3110株の染色体DNAを鋳型として前述と同一の条件でPCRを行った。

PCR終了後、エタノール沈殿法によりDNAの沈殿を取得した。該DNA沈殿を20 μ lのTEに溶解した。該溶解液5 μ lを用い、DNAを制限酵素Hind IIIおよびHinc IIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキットにより2.3 kbの断片を回収した。

pBluescript II SK+ DNA 0.2 μ gを制限酵素Hind IIIおよびEcoRVで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に3.0 kbの断片を回収した。

該2.3 kbの断片および3.0 kbの断片をライゲーションキットを用いて

16℃で16時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、galT、galK 遺伝子を含むプラスミドである pNT19 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第3図）。

該 pNT19 DNA 0.5 μ g を制限酵素 ClaI および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 2.3 kb の断片を回収した。実施例 1-1) で取得した pPAC31 DNA 0.2 μ g を制限酵素 ClaI および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 5.5 kb の断片を回収した。

該 2.3 kb の断片および 5.5 kb の断片をライゲーションキットを用いて 16℃で16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM52 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 μ g/ml を含む LB 寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、galT、galK 同時発現プラスミドである pNT25 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第3図）。

実施例 4. UDP-Gal の生産

1) galT、galK、galU、ppa 発現株の造成

実施例 1-3) で得た pNT32 DNA を用いてエシェリヒア・コリ NM522/pNT25 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 μ g/ml およびクロラムフェニコール 10 μ g/ml を含む LB 寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。生育してきた形質転換体を選択することにより、g

galT、galK、galU、ppa 発現株であるエシェリヒア・コリ NM522/pNT25/pNT32 株を得た。

2) UDP-Gal の生産

実施例 4-1) で得たエシェリヒア・コリ NM522/pNT25/pNT32 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた各々の培養物を遠心分離し、湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシェリヒア・コリ NM522/pNT25/pNT32 株湿菌体 50 g/l、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株湿菌体 150 g/l、グルコース 80 g/l、ガラクトース 20 g/l、 KH_2PO_4 15 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、オロット酸（カリウム塩）21.2 g/l、ナイミーン S-215 4 g/l、キシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 2 L を 5 L 容培養槽に入れ、該反応液を 600 rpm にて攪拌し、1 L/min にて通気し、 32°C で 26 時間反応を行った。

反応中、4N NaOH を用いて、該反応液の pH 7.2 に維持し、必要に応じて、グルコース、ガラクトース、 KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に 47.4 g/l の UDP-Gal (2Na 塩) が生成した。

実施例 5. galT、galK をコリネバクテリウム・アンモニアゲネスで発現する組換え体プラスミドの造成

エシェリヒア・コリ由来の galT、galK をコリネバクテリウム・アンモニアゲネスで発現する組換え体プラスミド pTK7 の造成方法について以下に述べる（第 4 図）。

1) pCG116 の造成

コリネバクテリウム・アンモニアゲネスで複製できるプラスミド p C G 1 1 6 の造成を以下のように行った。

プラスミド p C G 1 1 (特公平 6-91827) DNA 0.5 μ g を制限酵素 P s t I および S t u I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II キットにより 6.5 kb の断片を回収した。

一方、プラスミド p U C 1 9 DNA 1.0 μ g を制限酵素 E c o R I で切断後、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) により平滑末端化した。平滑末端化した該 DNA を P s t I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、MERmaid Kit (B i o l o 1 社製) により 4.3 bp の断片を回収した。

該 6.5 kb の断片および 4.3 bp の断片をライゲーションキットを用いて、16℃で16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてコリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株をエレクトロポレーション法 [FEMS Microbiol. Lett., 65, 299 (1989)] で形質転換し、該形質転換体をスペクチノマイシン 100 μ g/ml を含む LB 寒天培地に塗布後、30℃で2日間培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法 [J. Bacteriol., 159 306 (1984)] に従ってプラスミドを抽出し、プラスミド p C G 1 1 6 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (第4図)。

2) g a l T、g a l K を発現するプラスミド p T K 7 の造成

実施例 3 で造成した g a l T、g a l K を発現するプラスミド p N T 2 5 DNA 1.0 μ g を制限酵素 X h o I および B a m H I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II キットにより 3.5 kb の断片を回収した。

一方、実施例 5-1) で造成したプラスミド p C G 1 1 6 DNA 0.5 μ g を制限酵素 S a l I および B a m H I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 6.5 kb の断片を回収した。

該 3.5 kb の断片および 6.5 kb の断片をライゲーションキットを用いて

16℃で16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてコリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株をエレクトロポレーション法で形質転換し、該形質転換体をスペクチノマイシン 100 μ g/ml を含む LB 寒天培地に塗布後、30℃で2日間培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、galT、galK 同時発現プラスミドである pTK7 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (第4図)。

実施例6. UDP-Gal の生産

実施例5で得たコリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170/pTK7 株を実施例2と同様の方法で32℃で20時間培養した後、40℃で4時間培養し、得られた培養物を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170/pTK7 株湿菌体 150 g/l、フルクトース 40 g/l、ガラクトース 20 g/l、 KH_2PO_4 15 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、オロット酸 (カリウム塩) 10.6 g/l、ナイミーン S-215 4 g/l、キシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌 (900 rpm) し、32℃で22時間反応を行った。

反応中、4N NaOH を用いて、該反応液の pH 7.2 に維持し、必要に応じて、フルクトース、ガラクトース、 KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に 7.2 g/l の UDP-Gal (2Na 塩) が生成した。

実施例7. glmU、ppa、pgm、glmM、glk、pfkB 発現プラスミドの造成

1) g l m U、p p a 発現プラスミドの造成

配列番号 7 記載のセンス鎖 DNA プライマーと、配列番号 8 記載のアンチセンス鎖 DNA プライマーを合成した。該合成 DNA をプライマーとして、W3110 株の染色体 DNA を鋳型として前述と同一の条件で PCR を行った。

PCR 終了後、エタノール沈殿法により DNA の沈殿を取得した。該 DNA 沈殿を 20 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 H i n d III および B a m H I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II キットにより 1.4 kb の断片を回収した。実施例 1-1) で取得した p P A 3 1 DNA 0.5 μ g を制限酵素 H i n d III および B a m H I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 4.2 kb の断片を回収した。

該 1.4 kb の断片および 4.2 kb の断片をライゲーションキットを用いて 16℃ で 16 時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ KY8415 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 μ g / ml を含む LB 寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、g l m U 発現プラスミドである p N T 1 0 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (第 5 図)。

実施例 1-3) で取得した p N T 1 2 DNA 0.5 μ g を制限酵素 B a m H I および S a l I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し同様に 1.0 kb の断片を回収した。上記 p N T 1 0 DNA 0.2 μ g を制限酵素 B a m H I および S a l I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 5.3 kb の断片を回収した。

該 1.0 kb の断片および 5.3 kb の断片をライゲーションキットを用いて 16℃ で 16 時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ KY8415 株を前述の公知の方法に従

って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB 寒天培地に塗布後、 30°C で一晚培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、 glmU 、 ppa 同時発現プラスミドである pNT14 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第5図）。

2) pgm 発現プラスミドの造成

配列番号9記載のセンス鎖DNAプライマーと、配列番号10記載のアンチセンス鎖DNAプライマーを合成した。該合成DNAをプライマーとして、W3110株の染色体DNAを鋳型として前述と同一の条件でPCRを行った。

PCR終了後、エタノール沈殿法により、DNAの沈殿を取得した。該沈殿を $20 \mu\text{l}$ のTEに溶解した。該溶解液 $5 \mu\text{l}$ を用い、DNAを制限酵素 ClaI および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、ジーンクリーンIIキットにより 1.8 kb の断片を回収した。実施例1-1)で取得した $\text{pPAC31 DNA } 0.2 \mu\text{g}$ を制限酵素 ClaI および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に 5.5 kb の断片を回収した。

該 1.8 kb の断片および 5.5 kb の断片をライゲーションキットを用いて 16°C で16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB 寒天培地に塗布後、 30°C で一晚培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより前述の公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、 pgm 発現プラスミドである pNT24 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第6図）。

3) glmM 発現プラスミドの造成

配列番号11記載のセンス鎖DNAプライマーと配列番号12記載のアンチセンス鎖DNAプライマーを合成した。該合成DNAをプライマーとし、エシェリ

ヒア・コリ W3110 株の染色体 DNA を鋳型として前述と同一の条件で PCR を行った。

PCR 終了後、エタノール沈殿法により DNA の沈殿を取得した。該沈殿を 20 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 C l a I および B a m H I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II キットにより 1.6 kb の断片を回収した。実施例 1-1) で取得した p P A C 3 1 DNA 0.2 μ g を制限酵素 C l a I および B a m H I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 5.5 kb の断片を回収した。

該 1.6 kb の断片および 5.5 kb の断片をライゲーションキットを用いて 16 $^{\circ}$ C で 16 時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 μ g / l を含む LB 寒天培地に塗布後、30 $^{\circ}$ C で一晚培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、gel 1 mM 発現プラスミドである p N T 4 4 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (第 7 図)。

4) gel 1 k 発現プラスミドの造成

配列番号 13 記載のセンス鎖 DNA プライマーと配列番号 14 記載のアンチセンス鎖 DNA プライマーを合成した。該合成 DNA をプライマーとし、エシェリヒア・コリ W3110 株の染色体 DNA を鋳型として前述と同一の条件で PCR を行った。

PCR 終了後、エタノール沈殿法により DNA の沈殿を取得し、該沈殿を 20 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 H i n d III および B a m H I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II キットにより 0.5 kb の断片を回収した。

実施例 1-1) で取得した p P A 3 1 DNA 0.2 μ g を制限酵素 H i n d

ⅢおよびBamH Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に4.2 kbの断片を回収した。

該0.5 kbの断片および4.2 kbの断片をライゲーションキットを用いて16℃で16時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μg/lを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、g l kの一部を有するプラスミドであるpNT 45を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第8図)。

上述と同一の条件でPCRを行い、得られたDNA溶解液5 μlを用い、DNAを制限酵素Hind IIIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に0.5 kbの断片を回収した。上に記した方法で取得したpNT 45 DNA 0.2 μgを制限酵素Hind IIIで切断後アルカリホスファターゼにより脱リン酸化処理を行い、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に4.7 kbの断片を回収した。

該0.5 kbの断片および4.7 kbの断片をライゲーションキットを用いて16℃で16時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μg/lを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、g l kを発現するプラスミドであるpNT 46を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第8図)。

5) p f k B発現プラスミドの造成

配列番号15記載のセンス鎖DNAプライマーと配列番号16記載のアンチセンス鎖DNAプライマーを合成した。該合成DNAをプライマーとし、W3110株の染色体DNAを鋳型として前述と同一の条件でPCRを行った。

PCR終了後、エタノール沈殿法によりDNAの沈殿を取得した。該沈殿を20 μ lのTEに溶解した。該溶解液5 μ lを用い、DNAを制限酵素Hind IIIおよびEcoRVで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、ジーンクリーンIIキットにより1.3 kbの断片を回収した。pBluescript II SK+ DNA 0.2 μ gを制限酵素Hind III およびEcoRVで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に3.0 kbの断片を回収した。

該1.3 kbの断片および3.0 kbの断片をライゲーションキットを用いて16℃で16時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、p f k B 遺伝子を保有するプラスミド p NT 4 3 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第9図）。

p NT 4 3 DNA 0.5 μ gを用い、DNAを制限酵素Cla I およびSac I で切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に1.3 kbの断片を回収した。

実施例1-1) で取得したp PAC 3 1 DNA 0.2 μ gを制限酵素Cla I およびSac I で切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し同様に5.7 kbの断片を回収した。

該1.3 kbの断片および5.7 kbの断片をライゲーションキットを用いて16℃で16時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、p

f k B 発現プラスミドである p N T 4 7 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第 9 図）。

実施例 8. U D P - G l c N A c の生産

実施例 7 で得たエシェリヒア・コリ KY8415/pNT14 株、NM522/pNT24 株、NM522/pNT44 株、NM522/pNT47 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた各々の培養物を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて - 2 0 °C で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシェリヒア・コリ NM522/pNT24 株湿菌体 6 g / l、NM522/pNT47 株湿菌体 6 g / l、1 0 0 m M トリス塩酸緩衝液（p H 8. 0）、6 m M M g C l ₂ · 6 H₂O、1 0 m M グルコース-6-リン酸、2. 5 m M フルクトース 6-リン酸、2. 5 m M A T P、ナイミーン S - 2 1 5 4 g / l の組成からなる反応液 0. 1 m l を 1. 5 m l 容チューブに入れ、3 7 °C で 1 時間反応を行った。反応液を 6 5 °C で 5 分間処理後、エシェリヒア・コリ KY8415/pNT14 株湿菌体 0. 3 g / l、NM522/pNT44 株湿菌体 6 g / l、5 m M グルコサミン-6-リン酸、5 m M アセチル C o A、5 m M U T P となるように菌体および基質を添加し、さらに 3 7 °C で 3 0 分間反応させたところ、反応液中に 2. 5 m M（1. 6 g / l）の U D P - G l c N A c（2 N a 塩）が生成した。この際、エシェリヒア・コリ NM522/pNT24 株湿菌体あるいは NM522/pNT47 株湿菌体を添加しなかった場合の U D P - G l c N A c 生成量はそれぞれ 0. 0 8 m M、0. 1 6 m M であった。

このことは、p g m 発現株と p f k B 発現株の組み合わせにより、g l m M の活性発現に必要な G l c - 1, 6 - P 2 が供給できることを示している。

実施例 9. U D P - G l c N A c の生産

実施例 7 で得たエシェリヒア・コリ KY8415/pNT14 株、NM522/pNT24 株、NM522/pNT44 株、NM522/pNT46 株、NM522/pNT47 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた各々の培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテ

リウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシェリヒア・コリ KY8415/pNT14 株、NM522/pNT24 株、NM522/pNT44 株、NM522/pNT47 株、NM522/pNT46 株湿菌体を各 10 g/l 、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株湿菌体 150 g/l 、フルクトース 50 g/l 、グルコサミン塩酸塩 80 g/l 、 KH_2PO_4 15 g/l 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l 、フィチン酸 5 g/l 、オロット酸（カリウム塩） 10 g/l 、ナイミン S-215 4 g/l 、キシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、この反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌 (900 rpm) し、 32°C で 10 時間反応を行った。

反応中 4 N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じてフルクトース、 KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に 6.2 g/l の UDP-GlcNAc (2 Na 塩) が生成した。

実施例 10. galK 発現プラスミドの造成

実施例 3-1) で取得した pNT25 DNA $0.5\text{ }\mu\text{g}$ を制限酵素 ClaI および EcoRV で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II キットにより 6.7 kb の断片を回収した。回収した DNA を DNA Blunting Kit により平滑末端化した後、ライゲーションキットを用いて 16°C で 16 時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ を含む LB 寒天培地に塗布後 30°C で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、galK 発現プラスミドである pNT54 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素

消化により確認した（第10図）。

実施例11. UDP-GlcNAcの生産

実施例10で得たエシェリヒア・コリ NM522/pNT54 株を実施例2と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株を実施例2と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシェリヒア・コリ NM522/pNT54 株湿菌体 50 g/l 、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株湿菌体 150 g/l 、フルクトース 40 g/l 、N-アセチルグルコサミン 67 g/l 、 KH_2PO_4 15 g/l 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l 、フィチン酸 5 g/l 、オロット酸（カリウム塩） 10 g/l 、ナイミーン S-215 4 g/l 、キシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、この反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌（ 900 rpm ）し、 32°C で 27 時間反応を行った。

反応中 4 N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じてフルクトース、 KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に 17.1 g/l の UDP-GlcNAc（ 2 Na 塩）が生成した。

実施例12. UDP-GlcNAc と UDP-Gal の同時生産

実施例3で得た NM522/pNT25 株を実施例2と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株を実施例2と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシェリヒア・コリ NM522/pNT25 株湿菌体 25 g/l 、コリネバクテリウム・

アンモニアゲネス ATCC21170 株湿菌体 150 g/l、フルクトース 60 g/l、N-アセチルグルコサミン 50 g/l、ガラクトース 40 g/l、 KH_2PO_4 15 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、オロット酸（カリウム塩）10 g/l、ナイミーン S-215 4 g/l、キシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、この反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌（900 rpm）し、32℃で24時間反応を行った。

反応中 4N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じて KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に 11.4 g/l の UDP-GlcNAc（2Na 塩）および 18 g/l の UDP-Gal（2Na 塩）が生成した。

実施例 13. manB、manC、pgm、pfkB 発現プラスミドの造成

1) manB、manC 発現プラスミドの造成

配列番号 17 記載のセンス鎖 DNA プライマーと配列番号 18 記載のアンチセンス鎖 DNA プライマーを合成した。該合成 DNA をプライマーとし、エシェリヒア・コリ W3110 株染色体 DNA を鋳型として前述と同一の条件で PCR を行った。

PCR 終了後、エタノール沈殿法により DNA の沈殿を取得した。該沈殿を 20 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 Hind III および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II キットにより 3.0 kb の断片を回収した。pBluescript II SK+ DNA 0.2 μ g を制限酵素 Hind III および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 3.0 kb の断片を回収した。

該 3.0 kb の両断片をライゲーションキットを用いて 16℃で 16 時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従っ

て形質転換し、該形質転換体をアンピシリン $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB 寒天培地に塗布後、 30°C で一晚培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、*manC* および *manB* を含むプラスミドである *pNK6* を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第 11 図）。

該 *pNK6* DNA $0.5 \mu\text{g}$ を制限酵素 *ClaI* および *BamHI* で切断後アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し 3.0 kb の断片を回収した（実施例 1-1）で取得した *pPAC31* DNA $0.2 \mu\text{g}$ を制限酵素 *ClaI* および *BamHI* で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し同様に 5.5 kb の断片を回収した。

該 3.0 kb の断片および 5.5 kb の断片をライゲーションキットを用いて 16°C で 16 時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB 寒天培地に塗布後、 30°C で一晚培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、*manC* および *manB* 発現プラスミドである *pNK7* を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第 11 図）。

2) *pgm*、*pfkB* 同時発現プラスミドの造成

実施例 7 で取得した *pNT24* DNA $0.5 \mu\text{g}$ を制限酵素 *XhoI* および *BamHI* で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離しジーンクリーン II キットにより 3.0 kb の断片を回収した。一方、*pSTV28* DNA（宝酒造社製） $0.2 \mu\text{g}$ を制限酵素 *SaI* および *BamHI* で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 3.0 kb の断片を回収した。

該 3.0 kb の両断片をライゲーションキットを用いて 16°C で 16 時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をクロラムフェニコール $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB

寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、p g m 遺伝子を有するプラスミドである p N T 5 3 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第 1 2 図）。

配列番号 1 9 記載のセンス鎖 DNA プライマーを合成し、該センス鎖 DNA プライマーおよび配列番号 1 6 記載のアンチセンス鎖 DNA プライマーを用い、実施例 7 で取得したプラスミド p N T 4 7 DNA を鋳型として前述と同一の条件で P C R を行った。

P C R 終了後、エタノール沈殿法により DNA の沈殿を取得した。該沈殿を 20 μ l の T E に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 E c o R V および B g l II で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 1.3 k b の断片を回収した。p N T 5 3 DNA 0.2 μ g を制限酵素 S m a I および B a m H I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 6.0 k b の断片を回収した。

該 1.3 k b の断片および 6.0 k b の断片をライゲーションキットを用いて 16℃で 16 時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をクロラムフェニコール 10 μ g / m l を含む L B 寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、p g m および p f k B 発現プラスミドである p N T 5 5 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第 1 2 図）。

実施例 14. G D P - M a n の生産

1) m a n B、m a n C、p g m、p f k B 発現株の造成

実施例 13-2) で得た p N T 5 5 DNA を用いてエシェリヒア・コリ NM522/pNK7 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 μ g

／ml およびクロラムフェニコール $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB 寒天培地に塗布後、 30°C で一晚培養した。生育してきた形質転換体を選択することにより、man B、man C、pgm、pfkB 発現株であるエシェリヒア・コリ NM522/pNK7/pNT55 株を得た。

2) GDP-Man の生産

上記 1) で得たエシェリヒア・コリ NM522/pNK7/pNT55 株および実施例 7 で得たエシェリヒア・コリ NM522/pNT46 を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた各々の培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシェリヒア・コリ NM522/pNK7/pNT55 株湿菌体 $25 \text{ g}/\text{l}$ 、NM522/pNT46 株湿菌体 $25 \text{ g}/\text{l}$ 、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株湿菌体 $150 \text{ g}/\text{l}$ 、フルクトース $60 \text{ g}/\text{l}$ 、マンノース $50 \text{ g}/\text{l}$ 、 KH_2PO_4 $15 \text{ g}/\text{l}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $5 \text{ g}/\text{l}$ 、フィチン酸 $5 \text{ g}/\text{l}$ 、GMP (2Na, $7\text{H}_2\text{O}$ 塩) $60 \text{ g}/\text{l}$ 、ナイミーン S-215 $4 \text{ g}/\text{l}$ 、キシレン $10 \text{ ml}/\text{l}$ の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、この反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌 (900 rpm) し、24 時間反応を行った。

反応中 4 N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じて KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に $14.6 \text{ g}/\text{l}$ の GDP-Man (2Na, $1\text{H}_2\text{O}$ 塩) が生成した。

実施例 15. gmd、wcaG 発現プラスミドの造成

配列番号 20 記載のセンス鎖 DNA プライマーと配列番号 21 記載のアンチセンス鎖 DNA プライマーを合成した。該合成 DNA をプライマーとし、エシェリ

ヒア・コリ W3110 株染色体 DNA を鋳型として前述と同一の条件で PCR を行った。

PCR 終了後、エタノール沈殿法により DNA の沈殿を取得した。該沈殿を 20 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 H i n d III および X h o I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離しジーンクリーン II キットにより 2.3 kb の断片を回収した。

実施例 1-1) で取得した pPA31 DNA 0.2 μ g を制限酵素 H i n d III および S a l I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 3.9 kb の断片を回収した。

該 2.3 kb および 3.9 kb の断片をライゲーションキットを用いて、16 $^{\circ}$ C で 16 時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 μ g / ml を含む LB 寒天培地に塗布後、30 $^{\circ}$ C で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、gmd および wcaG を含むプラスミドである pNK8 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (第 13 図)。

実施例 16. GDP-Fuc の生産

実施例 14 で得たエシェリヒア・コリ NM522/pNK7/pNT55 株、実施例 15 で得た NM522/pNK8 株および実施例 7 で得た NM522/pNT46 を実施例 2 と同様の方法で培養し得られた各々の培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20 $^{\circ}$ C で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシェリヒア・コリ NM522/pNK7/pNT55 株湿菌体 25 g / l、エシェリヒア・コリ NM522/pNK8 株湿菌体 25 g / l、エシェリヒア・コリ NM522/pNT46 株湿菌

体 25 g/l、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株湿菌体 150 g/l、フルクトース 40 g/l、マンノース 60 g/l、 KH_2PO_4 15 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、GMP (2 Na/7 H_2O 塩) 60 g/l、ナイミーン S-215 4 g/l、キシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、この反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌 (900 rpm) し、32℃で24時間反応を行った。

反応中 4 N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じて KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に 1.0 g/l の GDP-Fuc (2.5 Na, 1 H_2O 塩) が生成した。

実施例 17. neuA 発現プラスミドの造成

エシェリヒア・コリ K235 株 (ATCC13027) 染色体 DNA を実施例 1 と同様の方法で調製した。

配列番号 22 記載のセンス鎖 DNA プライマーと配列番号 23 記載のアンチセンス鎖 DNA プライマーを合成した。該合成 DNA をプライマーとし、エシェリヒア・コリ K235 株 (ATCC13027) 染色体 DNA を鋳型として前述と同一の条件で PCR を行った。

PCR 終了後、エタノール沈殿法により DNA の沈殿を取得した。該沈殿を 20 μl の TE に溶解した。該溶解液 5 μl を用い、DNA を制限酵素 EcoRI および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジーンクリーン II キットにより 1.3 kb の断片を回収した。pBluescript II SK+ DNA 0.2 μg を制限酵素 EcoRI および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 3.0 kb の断片を回収した。

該 1.3 kb および 3.0 kb の断片をライゲーションキットを用いて 16℃

で16時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB 寒天培地に塗布後、 30°C で一晚培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、*neuA* 遺伝子を含むプラスミドである pTA12 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (第14図)。

該 pTA12 DNA $0.5 \mu\text{g}$ を制限酵素 ClaI および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 1.3 kb の断片を回収した。実施例 1-1) で取得した pPAC31 DNA $0.2 \mu\text{g}$ を制限酵素 ClaI および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 5.5 kb の断片を回収した。

該 1.3 kb の断片および 5.5 kb の断片をライゲーションキットを用いて 16°C で16時間連結反応を行った。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB 寒天培地に塗布後、 30°C で一晚培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、*neuA* 発現プラスミドである pTA14 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (第14図)。

実施例 18. CMP-*NeuAc* の生産

実施例 17 で得たエシェリヒア・コリ NM522/pTA14 株、C600/pNAL1 株 [Appl. Environ. Microbiol., 51 562 (1986)] および JF646/pMW5 株 [J. Biol. Chem., 261, 5568 (1986)] を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた各々の培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することが可能で、使

用前に解凍して用いることができる。

エシェリヒア・コリ NM522/pTA14 株湿菌体 50 g/l、エシェリヒア・コリ C600/pNAL1 株湿菌体 15 g/l、エシェリヒア・コリ JF646/pMW5 株湿菌体 25 g/l、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株湿菌体 150 g/l、オロット酸（カリウム塩） 10 g/l、ピルビン酸（Na 塩） 20 g/l、フルクトース 40 g/l、N-アセチルマンノサミン 10 g/l、 KH_2PO_4 15 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミーン S-215 4 g/l、キシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、この反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌（900 rpm）し、32℃で24時間反応を行った。

反応中 4N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じて KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に 2.7 g/l の CMP-NeuAc（Na 塩）が生成した。

実施例 19. ラクト-N-テトラオースの生産

1) β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの調製

プロテイン A の IgG 結合領域と β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼとの融合蛋白質をコードしている遺伝子を含むプラスミド pAMoERSAW1（特開平 6-181759）で形質転換したナマルバ KJM-1 株を G418（ギブコ社製）を 0.5 mg/ml 含む RPMI 640・ITPSGF 培地 30 ml に 5×10^4 cells/ml になるように懸濁し、 CO_2 インキュベーター中で 37℃で8日間培養した。

該培養液から遠心分離により細胞を除き上清を回収した。該上清は、必要に応じて -80℃で保存可能であり、使用前に解凍して使用することができる。

該プロテイン A の IgG 結合領域と β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼとの融合蛋白質が生成された培養上清にアジ化ナトリウムを最終濃度 0.1% にな

るように添加した後、製品説明書に従って前処理した I g G セファロース（ファルマシア社製）を 50 μ l 添加し、4℃で一晩緩やかに攪拌した。

攪拌後、遠心分離により β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの結合した I g G セファロースを回収し、R P M I 6 4 0 · I T P S G F 培地 1 m l で 3 回洗浄後、該 I g G セファロースを β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼの酵素源として用いた。

2) ラクトーN-テトラオースの生産

ラクトーN-ネオテトラオース（オックスフォード・グライコシステムズ社製）を公知の方法により [Agric. Biol. Chem., 54, 2169 (1990)] に従って 2-アミノピリジンにより蛍光標識した後、0.1 U の β -ガラクトシダーゼ（生化学工業社製）を加えて 37℃で 16 時間反応させ、非還元末端のガラクトースを除去した。

該反応液を、5 分間、100℃で加熱し、 β -ガラクトシダーゼを失活させた。

該反応により得られた G l c N A c β 1-3 G a l β 1-4 G l c を複合糖質前駆体として用いた。

該複合糖質前駆物質 0.5 mM、上記 1) で取得した I g G セファロース結合 β 1,3-ガラクトシルトランスフェラーゼ 0.5 U、実施例 4 で取得した U D P - G a l を含む反応液 6 μ l (5 mM)、100 mM トリス塩酸緩衝液 (p H 7.9) 10 mM M n C l₂、2 mM β -メルカプトエタノールの組成からなる反応液 36 μ l を、32℃で 65 時間放置し、反応を行った。

反応終了後、該反応液に蓄積された生成物を下記条件で H P L C を用いて定量した。

カラム：TSKgel ODS-80TM カラム (4.6mm x 30cm、TOSOH 社製)

液相：0.02 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (p H 4.0)

温度：50℃

流速：1 ml / min

検出：蛍光検出器（励起波長 320 nm、放射波長 400 nm）

生成物の同定はアミノピリジンで標識したラクトーN-テトラオースと標識された生成物の溶出時間を比較することにより行った。

該反応により 0.17 mM (0.12 g/l) のラクトーN-テトラオースが生成した。

実施例 20. ラクトーN-ネオテトラオースの生産

実施例 19 と同様な方法で、ラクトーN-ネオテトラオースから GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4 Glc を調製し、複合糖質前駆体として用いた。

該複合糖質前駆体 0.5 mM、 β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ（シグマ社製）0.5 U、実施例 4 で取得した UDP-Gal を含む反応液 6 μ l (5 mM)、100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.9)、10 mM MnCl₂、2 mM β -メルカプトエタノールの組成からなる反応液 36 μ l を、32℃で 5 時間放置し、反応を行った。

反応終了後、該反応液に蓄積された生成物を、実施例 19-2) と同様の条件で、HPLC を用いて定量した。なお、生成物の同定はアミノピリジンで標識したラクトーN-ネオテトラオースと生成物の溶出時間を比較することにより行った。

該反応により、0.15 mM (0.11 g/l) のラクトーN-ネオテトラオースが生成した。

実施例 21. ラクトーN-フコペンタオースⅢの生産

α 1,3-フコシルトランスフェラーゼの結合した IgG セファロースはプロテイン A の IgG 結合領域と α 1,3-フコシルトランスフェラーゼとの融合蛋白質をコードしている遺伝子を含むプラスミド pAMoA-FT6 [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)] で形質転換したナマルバ KJM-1 株から実施例 19-1) と同様な方法で調製し、 α 1,3-フコシルトランスフェラーゼの酵素源として用いた。

ラクトーN-ネオテトラオース（オックスフォード・グライコシステムズ社

製) 0.25 mM、1 g Gセファロース結合 α 1,3-フコシルトランスフェラーゼ 1.0 U、実施例 16 で取得した GDP-Fuc を含む反応液 6 μ l (0.25 mM)、100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.9)、10 mM MnCl₂ の組成からなる反応液 50 μ l を、37℃で24時間放置し、反応を行った。

反応終了後、該反応液に蓄積された生成物をダイオネックス社製の糖分析装置 (DX-500) にて定量した。なお、生成物の同定はラクトーN-フコペントースⅢ (オックスフォード・グライコシステムズ社製) と生成物の溶出時間を比較することにより行った。

該反応により、0.21 mM (0.18 g/l) のラクトーN-フコペントースⅢが生成した。

実施例 22. α 1,-4 ガラクトシルトランスフェラーゼ (1 g t C) 発現プラスミドの造成

Neisseria gonorrhoeae (ATCC33084 株) 染色体 DNA を実施例 1 と同一の方法で調製した。

配列番号 24 記載のセンス鎖 DNA プライマーと、配列番号 25 記載のアンチセンス鎖 DNA プライマーを合成した。該合成 DNA をプライマーとし、Neisseria gonorrhoeae (ATCC33084 株) 染色体 DNA を鋳型として前述と同一の条件で PCR を行った。

PCR 終了後、エタノール沈殿法により DNA の沈殿を取得した。該沈殿を 20 μ l の TE に溶解した。該溶解液 5 μ l を用い、DNA を制限酵素 HindⅢ および BamH I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、ジーンクリーンⅡキットにより 1.0 kb の断片を回収した。実施例 1—1) で取得した pPA31 DNA 0.2 μ g を制限酵素 HindⅢ および BamH I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 4.2 kb の断片を回収した。

該 1.0 kb の断片および 4.2 kb の断片をライゲーションキットを用いて

16℃で16時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む LB 寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、1 g t C 発現プラスミドである pGT3 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（第15図）。

実施例 23. グロボトリオースの生産

実施例 4 で得たエシェリヒア・コリ NM522/pNT25/pNT32 株、実施例 22 で得たエシェリヒア・コリ NM522/pGT3 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた各々の培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシェリヒア・コリ NM522/pNT25/pNT32 株湿菌体 $50 \text{ g}/\text{l}$ 、エシェリヒア・コリ NM522/pGT3 株湿菌体 $50 \text{ g}/\text{l}$ 、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株湿菌体 $150 \text{ g}/\text{l}$ 、フルクトース $100 \text{ g}/\text{l}$ 、ガラクトース $100 \text{ g}/\text{l}$ 、ラクトース $100 \text{ g}/\text{l}$ 、 KH_2PO_4 $15 \text{ g}/\text{l}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $5 \text{ g}/\text{l}$ 、フィチン酸 $5 \text{ g}/\text{l}$ 、オロット酸（カリウム塩） $10 \text{ g}/\text{l}$ 、ナイミーン S-215 $4 \text{ g}/\text{l}$ 、キシレン $10 \text{ ml}/\text{l}$ の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、この反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌（900 rpm）し、32℃で36時間反応を行った。

反応中は 4 N NaOH を用いて該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じてガラクトース、ラクトース、フルクトース、 KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に $188 \text{ g}/\text{l}$ のグロボトリオースが生成した。

該反応液から遠心分離により菌体を除去し、得られた上清 10 ml から、活性炭を用いる方法により精製を行い、グロボトリオースの白色粉末 1.5 g を得た。

実施例 24. Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc の生産

実施例 4 で得たエシェリヒア・コリ NM522/pNT25/pNT32 株、実施例 22 で得たエシェリヒア・コリ NM522/pGT3 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた各々の培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20℃ で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシェリヒア・コリ NM522/pNT25/pNT32 株湿菌体 50 g/l、エシェリヒア・コリ NM522/pGT3 株湿菌体 50 g/l、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株湿菌体 150 g/l、フルクトース 50 g/l、ガラクトース 50 g/l、N-アセチルラクトサミン 96 g/l、KH₂PO₄ 15 g/l、MgSO₄·7H₂O 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、オロット酸（カリウム塩）10 g/l、ナイミーン S-215 4 g/l、キシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、この反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌（900 rpm）し、32℃ で 23 時間反応を行った。

反応中は 4 N NaOH を用いて該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じてガラクトース、フルクトース、KH₂PO₄ を添加した。

該反応により、反応液中に 10 g/l の Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc が生成した。

該反応液から遠心分離により菌体を除去し、得られた上清 30 ml から、活性炭を用いる方法により生成物を精製し、Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc の白色粉末 0.2 g を得た。

実施例 25. β 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ（lg t B）発現プラスミドの造成

配列番号 26 記載のセンス鎖 DNA プライマーと配列番号 27 記載のアンチセ

ンス鎖DNAプライマーを合成した。該合成DNAをプライマーとし、N. gonorrhoeae (ATCC33084 株) 染色体DNAを鋳型として前述と同一の条件でPCRを行った。

PCR終了後、エタノール沈殿法によりDNAの沈殿を取得した。該沈殿を20 μ lのTEに溶解した。該溶解液5 μ lを用い、DNAを制限酵素H i n d III およびB a m H Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、ジーンクリーンIIキットにより0.8 kbの断片を回収した。pBluescriptII SK+ DNA 0.2 μ gを制限酵素H i n d IIIおよびB a m H Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に3.0 kbの断片を回収した。

該0.8 kbおよび3.0 kbの断片をライゲーションキットを用いて16℃、16時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、1 g t B遺伝子を含むプラスミドであるpNT60Pを得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(第16図)。

該pNT60P DNA 0.5 μ gを制限酵素C l a IおよびB a m H Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し0.8 kbの断片を回収した。実施例1-1)で取得したpPAC31 DNA 0.2 μ gを制限酵素C l a IおよびB a m H Iで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に5.5 kbの断片を回収した。

該0.8 kbの断片および5.5 kbの断片をライゲーションキットを用いて16℃、16時間連結反応を行った。該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリ NM522 株を常法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより常法に従ってプラスミドを抽出し、1

培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシェリヒア・コリ NM522/pNT25 株湿菌体 50 g/l 、エシェリヒア・コリ NM522/pNT60 株湿菌体 50 g/l 、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株湿菌体 150 g/l 、オロット酸（カリウム塩） 10 g/l 、グルコース 115 g/l 、ガラクトース 115 g/l 、 KH_2PO_4 15 g/l 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l 、フィチン酸 5 g/l 、ナイミーン S-215 4 g/l 、キシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、この反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌 (900 rpm) し、 32°C で 15 時間反応を行った。

反応中 4 N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じて KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に 49 g/l のラクトースが生成した。

実施例 28. グロボトリオースの生産

実施例 25 で得たエシェリヒア・コリ NM522/pNT60 株、実施例 3 で得たエシェリヒア・コリ NM522/pNT25 株および実施例 22 で得たエシェリヒア・コリ NM522/pGT3 を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた各々の培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。また、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株を実施例 2 と同様の方法で培養し、得られた培養物を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができる。

エシェリヒア・コリ NM522/pNT25 株湿菌体 50 g/l 、エシェリヒア・コリ NM522/pNT60 株湿菌体 50 g/l 、エシェリヒア・コリ NM522/pGT3 株湿菌体 50 g/l 、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC21170 株湿菌体 150

g/l、オロット酸（カリウム塩） 10 g/l、グルコース 115 g/l、ガラクトース 115 g/l、 KH_2PO_4 15 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミーンS-2 154 g/l、キシレン 10 ml/lの組成からなる反応液30 mlを200 ml容ビーカーに入れ、この反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌（900 rpm）し、32℃で13時間反応を行った。

反応中4N NaOHを用いて、該反応液のpHを7.2に維持し、必要に応じて KH_2PO_4 を添加した。

該反応により、反応液中に5 g/lのグロボトリオースが生成した。

産業上の利用可能性

本発明により、ヌクレオチドの前駆物質および糖のみを原料にして糖ヌクレオチドを、該糖ヌクレオチドおよび複合糖質前駆物質から複合糖質を工業的に効率よく製造できる。

配 列 表

配列番号：1

配列の長さ：31

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

GGAGAAAGCT TATGGCTGCC ATTAATACGA A

31

配列番号：2

配列の長さ：30

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

AACACGGATC CGGATGTTAC TTCTTAATGC

30

配列番号：3

配列の長さ：28

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

ATGGAGGATC CTGCTCTGTA TACCGTCT

28

配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

TGCTGGTCGA CCTGCGCTTG 20

配列番号：5

配列の長さ：31

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

AAGGAAAGCT TATGACGCAA TTTAATCCCG T 31

配列番号：6

配列の長さ：20

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

GCAAAGTTAA CAGTCGGTAC 20

配列番号：7

配列の長さ：31

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

TCAGGAAGCT TATGTTGAAT AATGCTATGA G 31

配列番号：8

配列の長さ：27

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

TCTCCGGATC CCATGTGACC GGGTTAG 27

配列番号：9

配列の長さ：28

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

TCTAAATCGA TGCAGACAAA GGACAAAG 28

配列番号：10

配列の長さ：27

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

TTGCAGGATC CTCGTAGGCC TGATAAG 27

配列番号：11

配列の長さ：20

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

TGATATCCGC TCCCTTTCCG

20

配列番号：12

配列の長さ：26

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

ACAGCGGATC CGATGTGTTT GCTGAG

26

配列番号：13

配列の長さ：29

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

ACAGCAAGCT TTTGACTTTA GCGGAGCAG

29

配列番号：14

配列の長さ：29

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

GAGTTGGATC CCGATATAAA AGGAAGGAT

29

配列番号：15

配列の長さ：25

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

TTTTTAAGCT TCATTATCA AGAGT

28

配列番号：16

配列の長さ：31

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

TTTTTGATAT CCCCAATGCT GGGGGTTTTT G

31

配列番号：17

配列の長さ：31

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

CGTCAAAGCT TAAATGATAT TCGGGGATAA T

31

配列番号：18

配列の長さ：25

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

AGGGAGGATC CGACATTACT CGTTC

25

配列番号：19

配列の長さ：33

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

CCGCAAGATC TCGTAAAAAG GGTATCGATA AGC

33

配列番号：20

配列の長さ：27

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

TTGGGAAGCT TCCGGCAAAT GTGGTTT

27

配列番号：21

配列の長さ：25

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

ATAAACTCGA GAGAGACAAG CGGAG

25

配列番号：22

配列の長さ：27

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

TATTATCGAT GAATTAATAA TTCATAG

27

配列番号：23

配列の長さ：25

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

CTCTGGATCC AGTTACGTAT AATAT

25

配列番号：24

配列の長さ：30

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

CGGCAAGCTT ATTGTGCCTT TCCAATAAAA

30

配列番号：25

配列の長さ：28

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

ACTTGATCC CCGTCAATAA ATCTTGCG

28

配列番号：26

配列の長さ：30

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

GGTAAAGCTT ATGCAAAACC ACGTTATCAG

30

配列番号：27

配列の長さ：29

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸、合成 DNA

配列

AAACGGATCC TTATTGGAAA GGCACAATA

29

請求の範囲

1. a) ヌクレオチドの前駆物質からヌクレオシド-5'-三リン酸（以下、NTPと略す）を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、およびb) 糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、を酵素源として用い、これら酵素源、ヌクレオチドの前駆物質および糖を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に糖ヌクレオチドを生成蓄積させ、該水性媒体中から糖ヌクレオチドを採取することを特徴とする糖ヌクレオチドの製造法。

2. a) ヌクレオチドの前駆物質からヌクレオシド-5'-三リン酸（以下、NTPと略す）を生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、b) 糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、およびc) 糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液または該培養液の処理物、を酵素源として用い、これら酵素源、ヌクレオチドの前駆物質、糖および複合糖質前駆物質を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造法。

3. 糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源、複合糖質前駆物質および請求項1記載の製造法により得られた糖ヌクレオチドを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中から複合糖質を採取することを特徴とする複合糖質の製造法。

4. 培養液の処理物が、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる培養上清、該培養上清の濃縮物、培養上清から得られる酵素標品、培養液を遠心分離して得られる細胞、該細胞の乾燥物、該細胞の凍結乾燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の超音波処理物、該細胞の機械的摩砕処理物、

該細胞の溶媒処理物、該細胞の酵素処理物、該細胞の蛋白質分画物、該細胞の固定化物あるいは該細胞より抽出して得られる酵素標品であることを特徴とする、請求項1、2または3記載の製造法。

5. スクレオチドの前駆物質が、オロット酸、ウラシル、オロチジン、ウリジン、シトシン、シチジン、アデニン、アデノシン、グアニン、グアノシン、ヒポキサンチン、イノシン、キサンチン、キサントシン、イノシン-5' -リン酸、キサントシン-5' -リン酸、グアノシン-5' -リン酸、ウリジン-5' -リン酸またはシチジン-5' -リン酸である請求項1または2記載の製造法。

6. 糖スクレオチドが、ウリジン二リン酸化合物、グアノシン二リン酸化合物またはシチジン二リン酸化合物である、請求項1、2または3記載の製造法

7. ウリジン二リン酸化合物、グアノシン二リン酸化合物およびシチジン二リン酸化合物が、ウリジン二リン酸グルコース、ウリジン二リン酸ガラクトース、ウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン、ウリジン二リン酸-N-アセチルガラクトサミン、ウリジン二リン酸グルクロン酸、グアノシン二リン酸マンノース、グアノシン二リン酸フコース、シチジン二リン酸-N-アセチルノイラミン酸およびこれらの誘導体から選ばれる化合物である、請求項6記載の製造法。

8. 糖が、グルコース、フルクトース、ガラクトース、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、マンノース、フコース、N-アセチルマンノサミン、アセチルノイラミン酸およびこれらの誘導体から選ばれる糖である、請求項1または2記載の製造法。

9. 複合糖質が、グルコース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、グルクロン酸、マンノース、N-アセチルマンノサミン、フコース、シアル酸、ラクトース、N-アセチルラクトサミン、ラクト-N-ビオース、 $\text{GlcNAc } \beta 1-3 \text{ Gal } \beta 1-4 \text{ Glc}$ 、 $\text{GlcNAc } \beta 1-4 \text{ Gal } \beta 1-4 \text{ Glc}$ 、グロボトリオース、 $\text{Gal } \alpha 1-4 \text{ Gal } \beta 1-4 \text{ GlcNAc}$

c、2'-フコシルラクトース、3-フコシルラクトース、3'-シアリルラクトース、6'-シアリルラクトース、3'-シアリル-N-アセチルラクトサミン、6'-シアリル-N-アセチルラクトサミン、シアリルラクト-N-ビオース、ルイスX、ルイスa、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-ネオテトラオース、ラクトジフコテトラオース、3'-シアリル 3-フコシルラクトース、シアリルルイスX、シアリルルイスa、ラクト-N-フコペンタオースI、ラクト-N-フコペンタオースII、ラクト-N-フコペンタオースIII、ラクト-N-フコペンタオースV、LS-テトラサッカライドa、LS-テトラサッカライドb、LS-テトラサッカライドc、(α 2, 3)シアリルラクト-N-ネオテトラオース、ラクト-N-ジフコヘキサオースI、ラクト-N-ジフコヘキサオースII、ラクト-N-ヘキサオース、ラクト-N-ネオヘキサオース、ジシアリルラクト-N-テトラオースおよびこれらの誘導体から選ばれる糖を1あるいはそれ以上含有する複合糖質または該複合糖質を含む複合糖質である、請求項2または3記載の製造法。

10. 複合糖質が、Gal β 1-3 Glc、Gal β 1-4 Glc、Gal β 1-3 GlcNAc、Gal β 1-4 GlcNAc、Gal β 1-3 Gal、Gal β 1-4 Gal、Gal β 1-3 GalNAc、Gal β 1-4 GalNAc、Gal α 1-3 Glc、Gal α 1-4 Glc、Gal α 1-3 GlcNAc、Gal α 1-4 GlcNAc、Gal α 1-3 Gal、Gal α 1-4 Gal、Gal α 1-3 GalNAc、Gal α 1-4 GalNAc、GlcNAc β 1-3 Gal、GlcNAc β 1-4 Gal、GlcNAc β 1-6 Gal、GlcNAc β 1-3 Glc、GlcNAc β 1-4 Glc、GlcNAc β 1-3 GlcNAc、GlcNAc β 1-4 GlcNAc、GlcNAc β 1-6 GalNAc、GlcNAc β 1-2 Man、GlcNAc β 1-4 Man、GlcNAc β 1-6 Man、GalNAc β 1-3 Gal、GalNAc β 1-4 Gal、GalNAc β 1-4 GlcNAc、GalNAc α 1-3 GalNAc、Man β 1-4 GlcNAc、Man α 1-6 Man、Man α 1-3 Man、Man α 1-2 Man、GlcUA β 1-4 GlcN、GlcUA β 1-3 Gal、GlcUA β 1-3 GlcNAc、GlcUA β 1-3 GalNAc、N

e u A c α 2-3 G a l、Ne u A c α 2-6 G a l、Ne u A c α 2-3 G l c N A c、Ne u A c α 2-6 G l c N A c、Ne u A c α 2-3 G a l N A c、Ne u A c α 2-6 G a l N A c、Ne u A c α 2-8 Ne u A c、F u c α 1-3 G l c、F u c α 1-4 G l c、F u c α 1-3 G l c N A c、F u c α 1-4 G l c N A c、F u c α 1-2 G a l および F u c α 1-6 G l c N A c から選ばれる結合を有する糖を含む複合糖質または該複合糖質を含む複合糖質である、請求項 2 または 3 記載の製造法。

11. 複合糖質に含まれる糖が 10 個以下である、請求項 9 または 10 記載の方法。

12. 複合糖質に含まれる糖が 6 個以下である、請求項 9 または 10 記載の方法。

13. 複合糖質前駆物質が、単糖、オリゴサッカライド、蛋白質、ペプチド、脂質、糖蛋白質、糖脂質、グリコペプチドおよびステロイド化合物から選ばれる複合糖質前駆物質である、請求項 2 または 3 記載の製造法。

14. 複合糖質前駆物質が、グルコース、ガラクトース、マンノース、シアル酸、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、ラクトース、N-アセチルラクトサミン、ラクト-N-ビオース、G l c N A c β 1-3 G a l β 1-4 G l c、G l c N A c β 1-4 G a l β 1-4 G l c、グロボトリオース、G a l α 1-4 G a l β 1-4 G l c N A c、2'-フコシルラクトース、3-フコシルラクトース、3'-シアリルラクトース、6'-シアリルラクトース、3'-シアリル-N-アセチルラクトサミン、6'-シアリル-N-アセチルラクトサミン、シアリルラクト-N-ビオース、ルイス X、ルイス a、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-ネオテトラオース、ラクトジフコテトラオース、3'-シアリル-3-フコシルラクトース、シアリルルイス X、シアリルルイス a、ラクト-N-フコペンタオース I、ラクト-N-フコペンタオース II、ラクト-N-フコペンタオース III、ラクト-N-フコペンタオース V、LS-テトラサッカライド a、LS-テトラサッカライド b、LS-テトラサッカライド c、(α 2, 3) シアリルラクト-N-ネオテ

トラオースおよびこれらの誘導体、セリン、スレオニン、アスパラギンおよび該アミノ酸を含有するペプチドおよびその誘導体、セラミドおよびその誘導体から選ばれる複合糖質前駆物質または該複合糖質前駆物質を含む複合糖質前駆物質である、請求項 13 記載の製造法。

15. ヌクレオチドの前駆物質から NTP を生産する能力を有する微生物が、コリネバクテリウム属に属する微生物から選ばれる微生物であることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の製造法。

16. コリネバクテリウム属に属する微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスであることを特徴とする請求項 15 記載の製造法。

17. 糖と NTP から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、1 種類ないしそれ以上の微生物より構成されることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の製造法。

18. 微生物が、エシェリヒア属およびコリネバクテリウム属に属する微生物から選ばれる 1 種類ないしそれ以上の微生物であることを特徴とする、請求項 17 記載の製造法

19. エシェリヒア属に属する微生物がエシェリヒア・コリである、請求項 18 記載の製造法。

20. コリネバクテリウム属に属する微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスである、請求項 18 記載の製造法。

21. 糖と NTP から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、グルコキナーゼ（以下、g l k と略す）、ホスホグルコムターゼ（以下、p g m と略す）、グルコース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ（以下、g a l U と略す）およびピロフォスファターゼ（以下、p p a と略す）から選ばれる 1 つ以上の酵素の活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の製造法。

22. 微生物が、g l k をコードする遺伝子、p g m をコードする遺伝子、g a l U をコードする遺伝子および p p a をコードする遺伝子から選ばれる 1 種

類以上の遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する1種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項21記載の製造法。

23. g l kをコードする遺伝子、p g mをコードする遺伝子、g a l Uをコードする遺伝子およびp p aをコードする遺伝子が、エシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項22記載の製造法。

24. 糖ヌクレオチドがウリジン二リン酸グルコースである、請求項21記載の製造法。

25. 微生物がウリジン二リン酸グルコースデヒドロゲナーゼ活性の強い微生物であり、糖ヌクレオチドがウリジン二リン酸グルクロン酸である、請求項21記載の製造法。

26. 糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、ガラクトキナーゼ（以下、g a l Kと略す）活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項1または2記載の製造法。

27. 請求項26記載のg a l K活性の強い微生物により、N-アセチルグルコサミンを基質にしてN-アセチルグルコサミン-1-リン酸が供給されることを特徴とする、請求項26記載の製造法。

28. 微生物が、g a l Kをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する1種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項26記載の製造法。

29. g a l Kをコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項28記載の製造法。

30. 糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ（以下、g a l Tと略す）活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項26記載の製造法。

31. 微生物が、g a l Tをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する1種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項30記載の製造法。

32. galTをコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項31記載の製造法。

33. 糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、グルコキナーゼ（以下、glkと略す）、ホスホグルコムターゼ（以下、pgmと略す）、グルコース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ（以下、galUと略す）およびピロフォスファターゼ（以下、ppaと略す）から選ばれる1つ以上の酵素の活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項30記載の製造法。

34. 微生物が、glkをコードする遺伝子、pgmをコードする遺伝子、galUをコードする遺伝子およびppaをコードする遺伝子から選ばれる1種類以上の遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する1種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項33記載の製造法。

35. glkをコードする遺伝子、pgmをコードする遺伝子、galUをコードする遺伝子およびppaをコードする遺伝子エシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項34記載の製造法。

36. 糖ヌクレオチドがウリジン-リン酸ガラクトースである、請求項30または33記載の製造法。

37. 糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、N-アセチルグルコサミン-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ（以下、glmUと略す）活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項26記載の製造法。

38. 微生物が、glmUをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する1種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項37記載の製造法。

39. glmUをコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項38記載の製造法。

40. 糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、

ホスホグルコムターゼ（以下 p g m と略す）およびホスホフルクトキナーゼ（以下、p f k B と略す）活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の製造法。

4 1. 微生物が、p g m をコードする遺伝子、p f k B をコードする遺伝子から選ばれる 1 種類以上の遺伝子を含む DNA 断片とベクターとの組換え体 DNA を保有する 1 種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項 4 0 記載の製造法。

4 2. p g m をコードする遺伝子、p f k B をコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項 4 1 記載の製造法。

4 3. 請求項 4 0 記載の p g m および p f k B 活性の強い微生物により、グルコース-6-リン酸およびフルクトース-6-リン酸を基質にして、グルコース-1, 6-二リン酸が供給されることを特徴とする、請求項 4 0 記載の製造法。

4 4. 請求項 4 3 記載の方法により供給されたグルコース-1, 6-二リン酸により、ホスホグルコサミンムターゼまたはホスホマンノムターゼ活性が増強されることを特徴とする、請求項 4 3 記載の製造法。

4 5. 糖と N T P から糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、グルコサミン-1-リン酸アセチルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ（以下、g l m U と略す）、ピロフォスファターゼ（以下、p p a と略す）、ホスホグルコサミンムターゼ（以下、g l m M と略す）、グルコキナーゼ（以下、g l k と略す）から選ばれる 1 つ以上の酵素の活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項 4 0 記載の製造法。

4 6. 微生物が、g l m U をコードする遺伝子、p p a をコードする遺伝子、g l m M をコードする遺伝子および g l k をコードする遺伝子から選ばれる 1 種類以上の遺伝子を含む DNA 断片とベクターとの組換え体 DNA を保有する 1 種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項 4 5 記載の製造法。

4 7. g l m U をコードする遺伝子、p p a をコードする遺伝子、g l m

Mをコードする遺伝子およびg l kをコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項46記載の製造法。

48. 糖ヌクレオチドがウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミンである、請求項26、37、40または45記載の製造法。

49. 微生物がUDP-G l c N A c 4-エピメラーゼ活性の強い微生物であり、糖ヌクレオチドがウリジン二リン酸-N-アセチルガラクトサミンである、請求項26、37、40または45記載の製造法。

50. 糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、ホスホマンノムターゼ（以下、m a n Bと略す）、マンノース-1-リン酸グアニルトランスフェラーゼ（以下、m a n Cと略す）、グルコキナーゼ（以下、g l kと略す）から選ばれる1つ以上の酵素の活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項40記載の製造法。

51. 微生物が、m a n Bをコードする遺伝子、m a n Cをコードする遺伝子、g l kをコードする遺伝子から選ばれる1種類以上の遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する1種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項50記載の製造法。

52. m a n Bをコードする遺伝子、m a n Cをコードする遺伝子、g l kをコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項51記載の製造法。

53. 糖ヌクレオチドがグアノシン二リン酸マンノースである、請求項40または50記載の製造法。

54. 糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、ホスホマンノムターゼ（以下、m a n Bと略す）、マンノース-1-リン酸グアニルトランスフェラーゼ（以下、m a n Cと略す）、グルコキナーゼ（以下、g l kと略す）、GDP-4,6-マンノースデヒドラターゼ（以下、g m dと略す）およびGDP-4-ケト-6-デオキシマンノース エピメラーゼ/レダクターゼ（以下、w c a Gと略す）から選ばれる1つ以上の酵素の活性の強い微生物

物であることを特徴とする、請求項40記載の製造法。

55. 微生物が、manBをコードする遺伝子、manCをコードする遺伝子、glkをコードする遺伝子、gmdをコードする遺伝子およびwcaGをコードする遺伝子から選ばれる1種類以上の遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する1種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項54記載の製造法。

56. manBをコードする遺伝子、manCをコードする遺伝子、glkをコードする遺伝子、gmdをコードする遺伝子およびwcaGをコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項55記載の製造法。

57. 糖ヌクレオチドがグアノシン二リン酸フコースである、請求項40または54記載の製造法。

58. 糖とNTPから糖ヌクレオチドを生産する能力を有する微生物が、GlcNAc 2-エピメラーゼ、CMP-NeuAcシンセターゼ（以下、neuAと略す）、NeuAcアルドラーゼ（以下、nanAと略す）、NeuAcシンセターゼ（以下、neuBと略す）およびCTPシンセターゼ（以下、pyrGと略す）から選ばれる1つ以上の酵素の活性の強い微生物であることを特徴とする、請求項1または2記載の製造法。

59. 微生物が、GlcNAc 2-エピメラーゼをコードする遺伝子、neuAをコードする遺伝子、nanAをコードする遺伝子、neuBをコードする遺伝子およびpyrGをコードする遺伝子から選ばれる1種類以上の遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する1種類以上の微生物から構成されることを特徴とする、請求項58記載の製造法。

60. neuAをコードする遺伝子、nanAをコードする遺伝子、neuBをコードする遺伝子およびpyrGをコードする遺伝子がエシェリヒア・コリ由来の遺伝子であることを特徴とする、請求項59記載の製造法。

61. 糖ヌクレオチドがシチジーン-リン酸-N-アセチルノイラミン酸で

ある、請求項 5 8 記載の製造法。

6 2. 糖ヌクレオチドと複合糖質前駆物質から複合糖質を生産する能力を有する微生物が、エシェリヒア・コリまたはサッカロマイセス・セレビシエまたはコリネバクテリウム・アンモニアゲネスであることを特徴とする請求項 2 または 3 記載の製造法。

6 3. 微生物が、グルコシルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、グルクロノシルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよびフコシルトランスフェラーゼから選ばれるトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含む DNA 断片とベクターとの組換え体 DNA を保有する微生物であることを特徴とする、請求項 6 2 記載の製造法。

6 4. グルコシルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、グルクロノシルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよびフコシルトランスフェラーゼから選ばれるトランスフェラーゼをコードする遺伝子が微生物由来であることを特徴とする、請求項 6 3 記載の製造法。

6 5. 動物細胞が、COS-7 細胞またはナマルバ K J M-1 細胞であり、昆虫細胞が Sf 9 細胞であることを特徴とする、請求項 2 または 3 記載の製造法。

6 6. 動物細胞あるいは昆虫細胞が、グルコシルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、グルクロノシルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよびフコシルトランスフェラーゼから選ばれるトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含む DNA 断片とベクターとの組換え体 DNA を保有する動物細胞あるいは昆虫細胞であることを特徴とする、請求項 2 または 3 記載の製造法。

67. グルコシルトランスフェラーゼ、ガラクトシルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ、グルクロノシルトランスフェラーゼ、マンノシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼおよびフコシルトランスフェラーゼから選ばれるトランスフェラーゼをコードする遺伝子が動物細胞由来であることを特徴とする、請求項66記載の製造法。

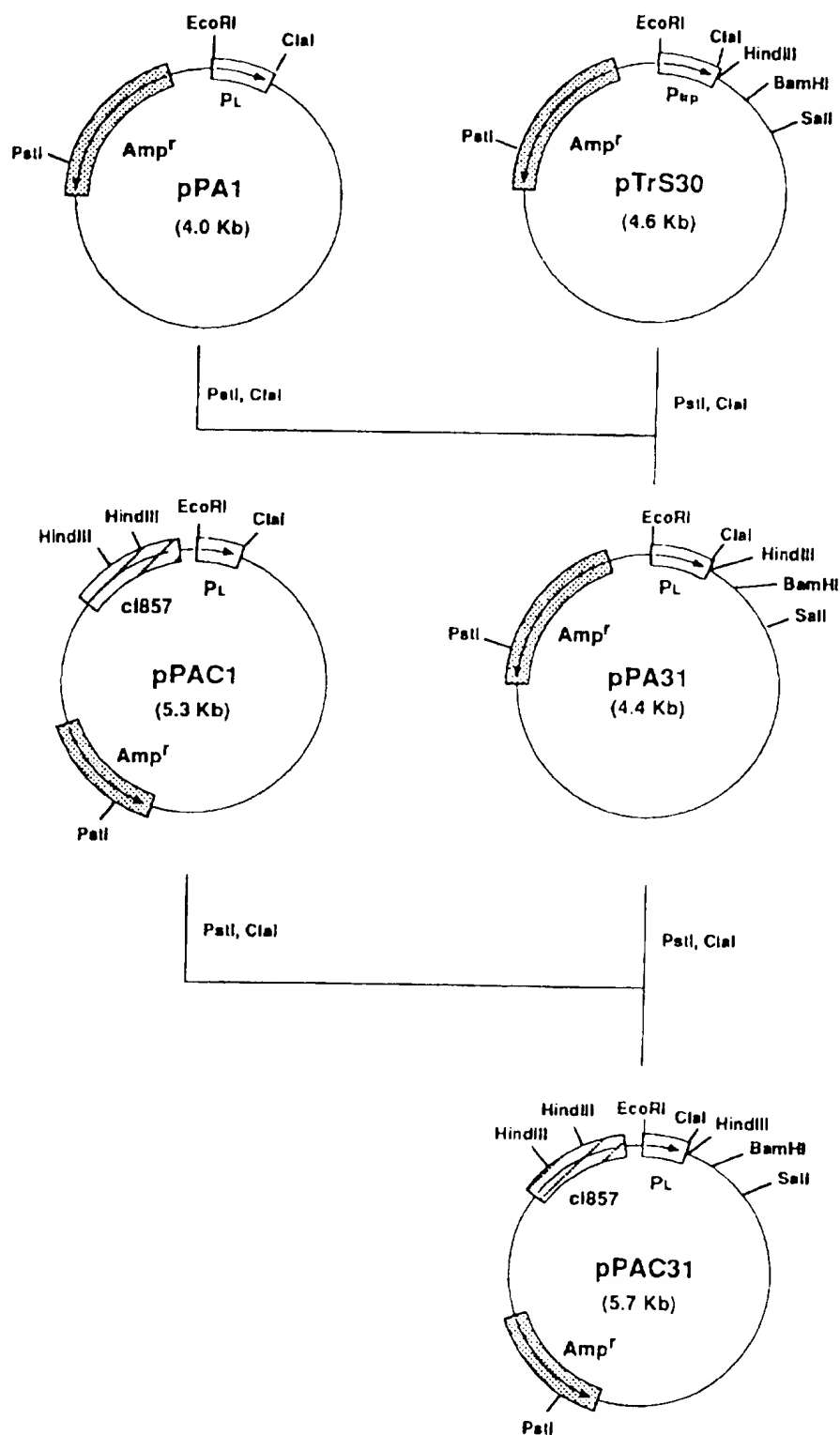
68. 請求項26記載のgalK活性の強い微生物の培養液または該培養液の処理物を酵素源として用い、該酵素源およびN-アセチルグルコサミンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にN-アセチルグルコサミン-1-リン酸を生成蓄積させ、該水性媒体中からN-アセチルグルコサミン-1-リン酸を採取することを特徴とするN-アセチルグルコサミン-1-リン酸の製造法。

69. 微生物が、galKをコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する微生物である、請求項68記載の製造法。

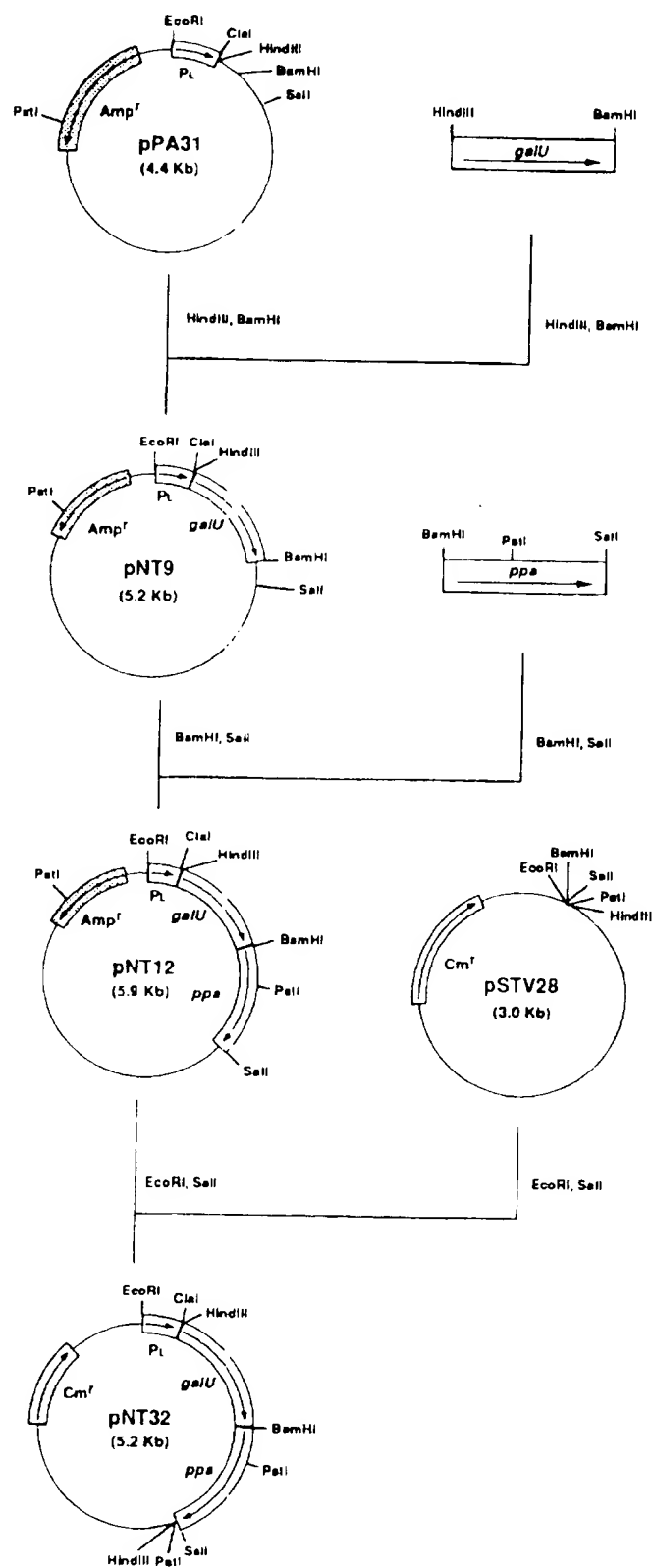
70. galKをコードする遺伝子が、エシェリヒア・コリ由来のガラクトキナーゼをコードする遺伝子である、請求項69記載の製造法。

71. 培養液の処理物が、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液を遠心分離して得られる培養上清、該培養上清の濃縮物、培養上清から得られる酵素標品、培養液を遠心分離して得られる細胞、該細胞の乾燥物、該細胞の凍結乾燥物、該細胞の界面活性剤処理物、該細胞の超音波処理物、該細胞の機械的摩砕処理物、該細胞の溶媒処理物、該細胞の酵素処理物、該細胞の蛋白質分画物、該細胞の固定化物あるいは該細胞より抽出して得られる酵素標品であることを特徴とする、請求項68記載の製造法。

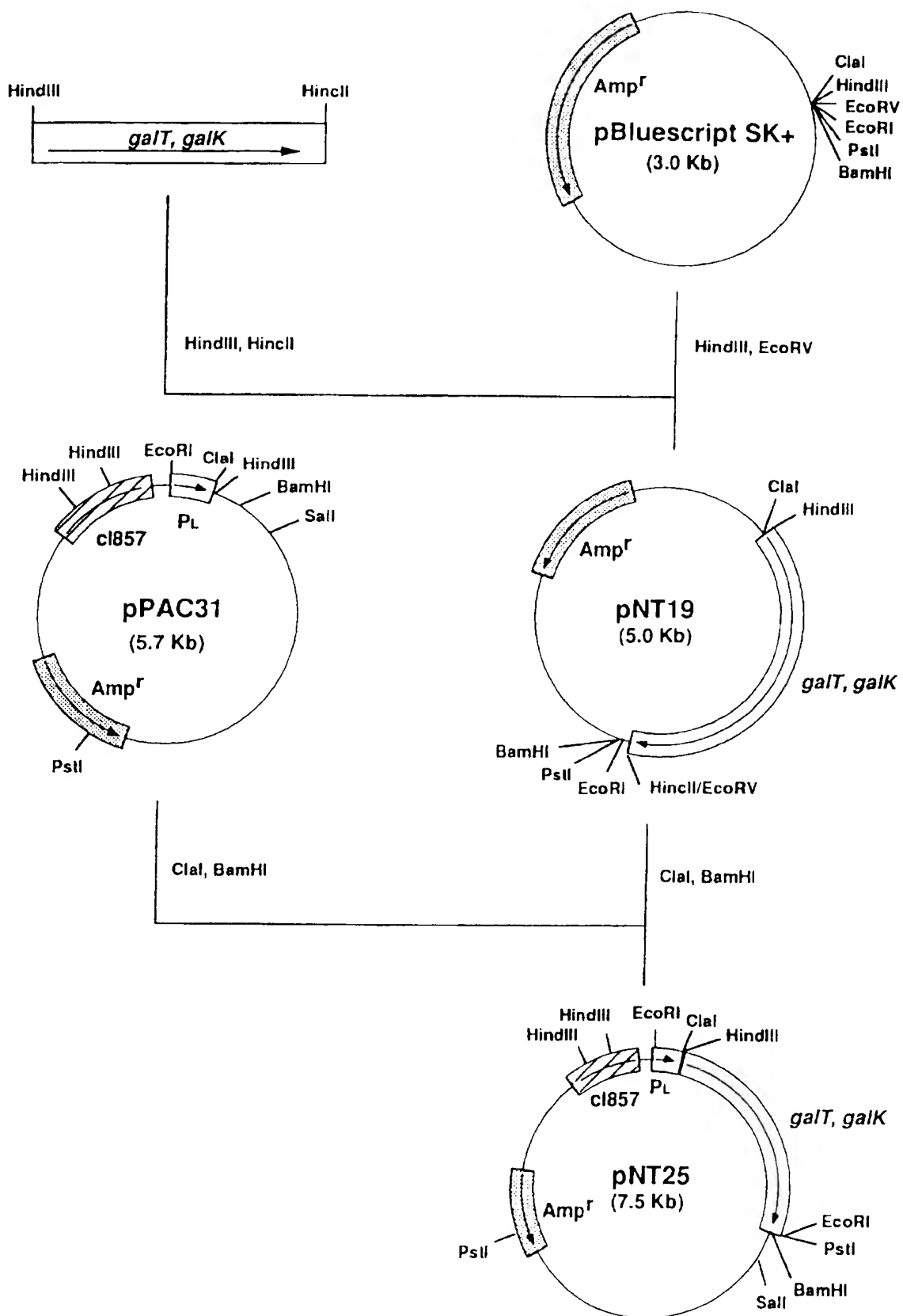
第 1 図



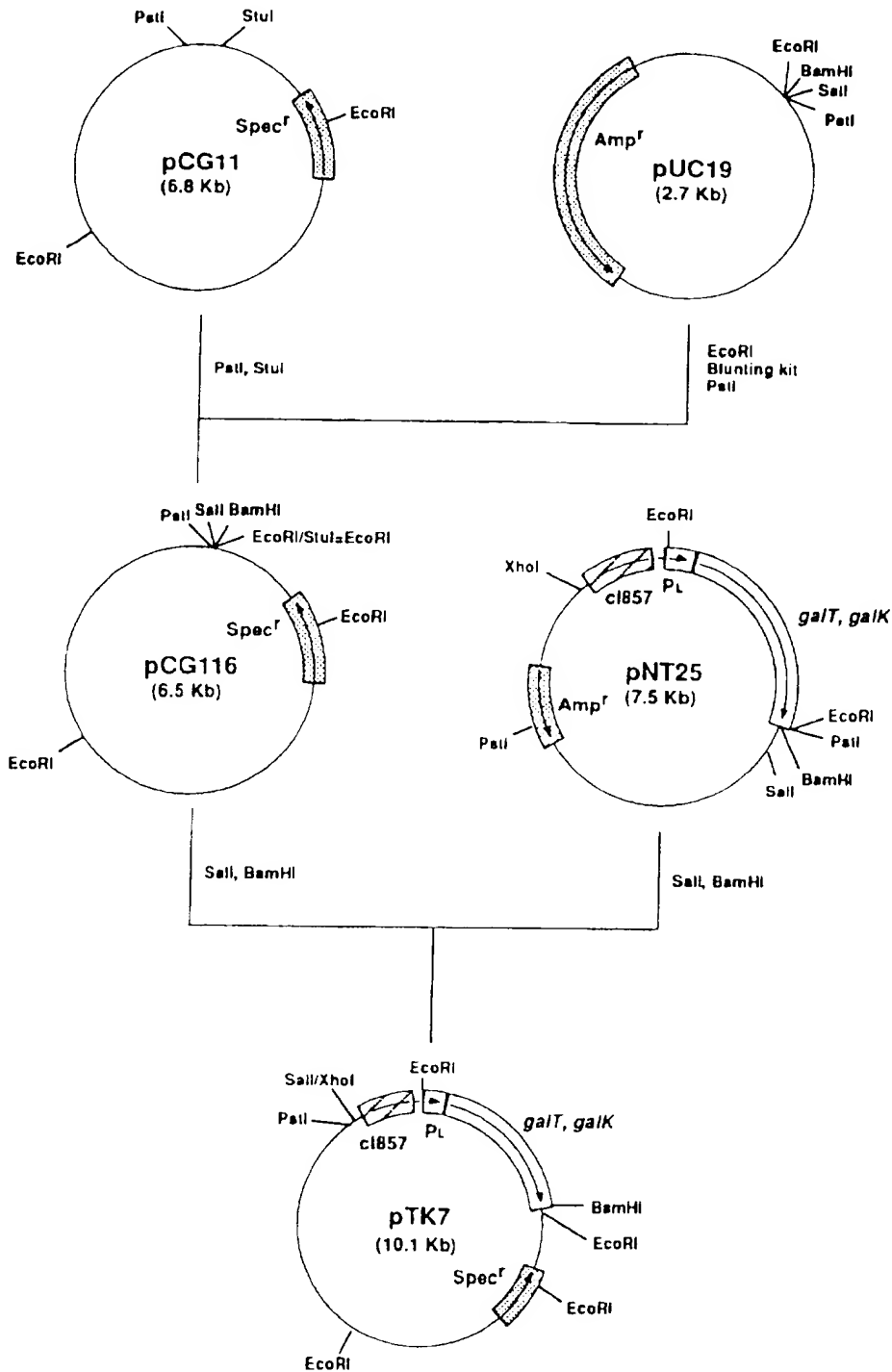
第 2 図



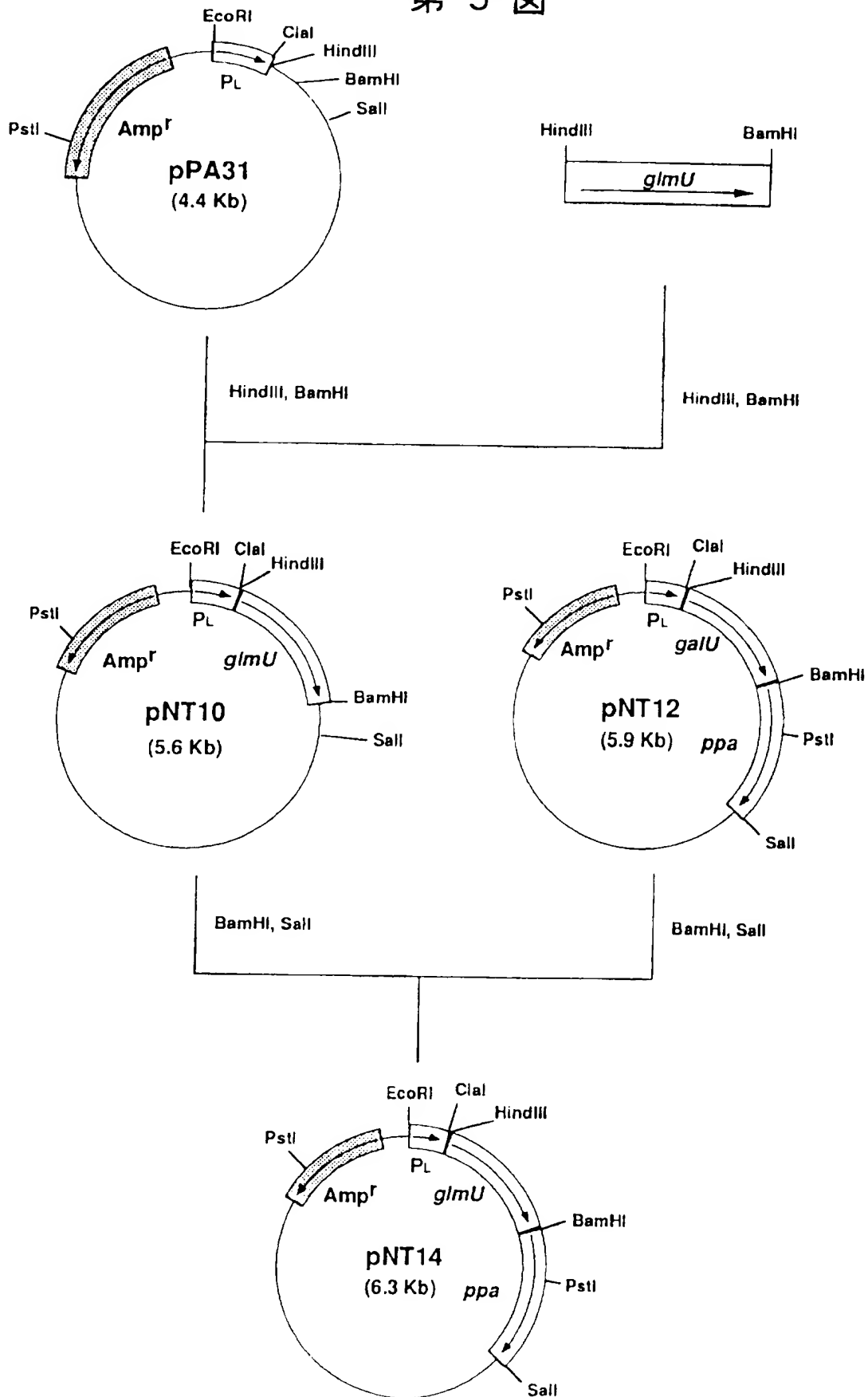
第 3 図



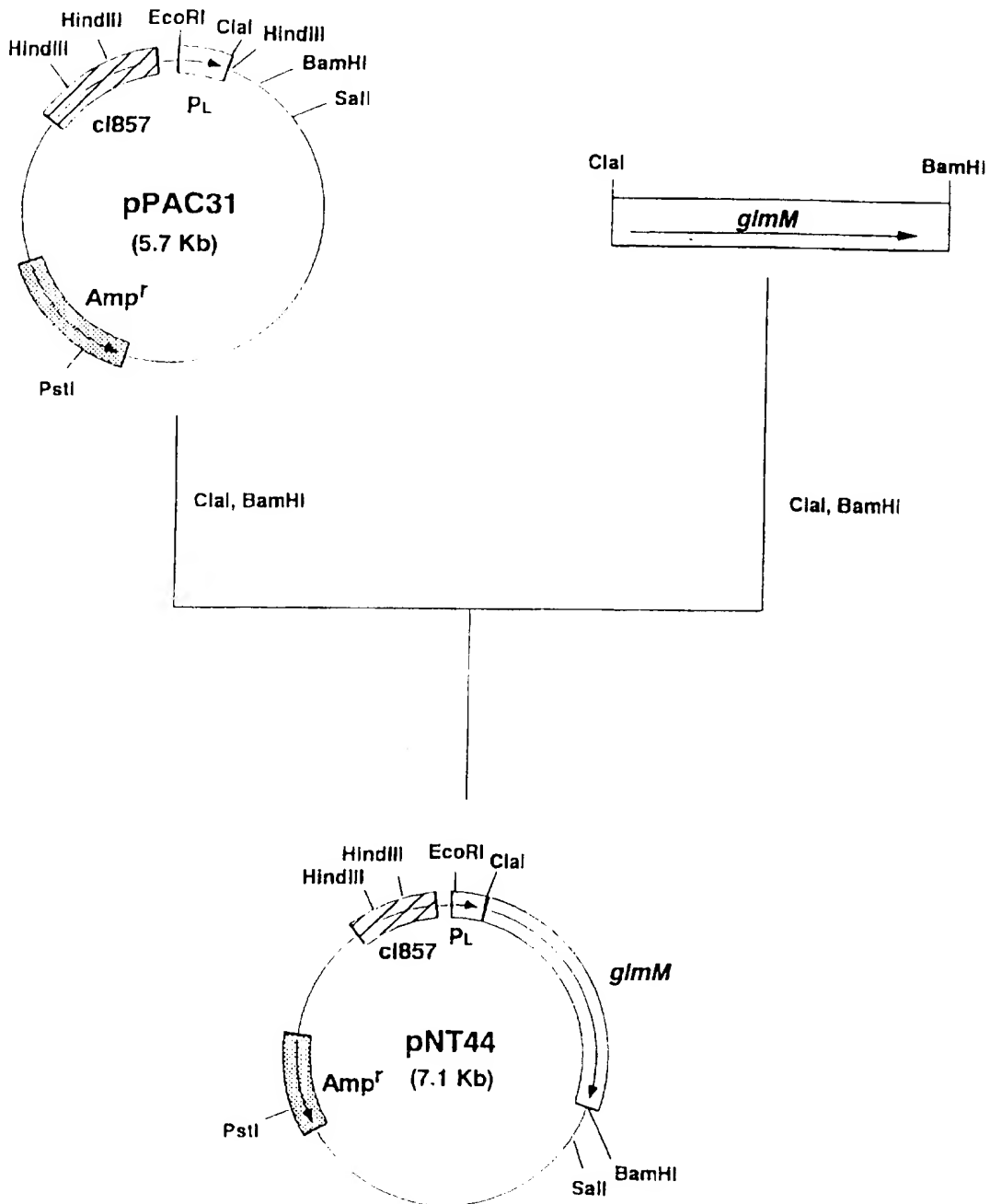
第 4 図



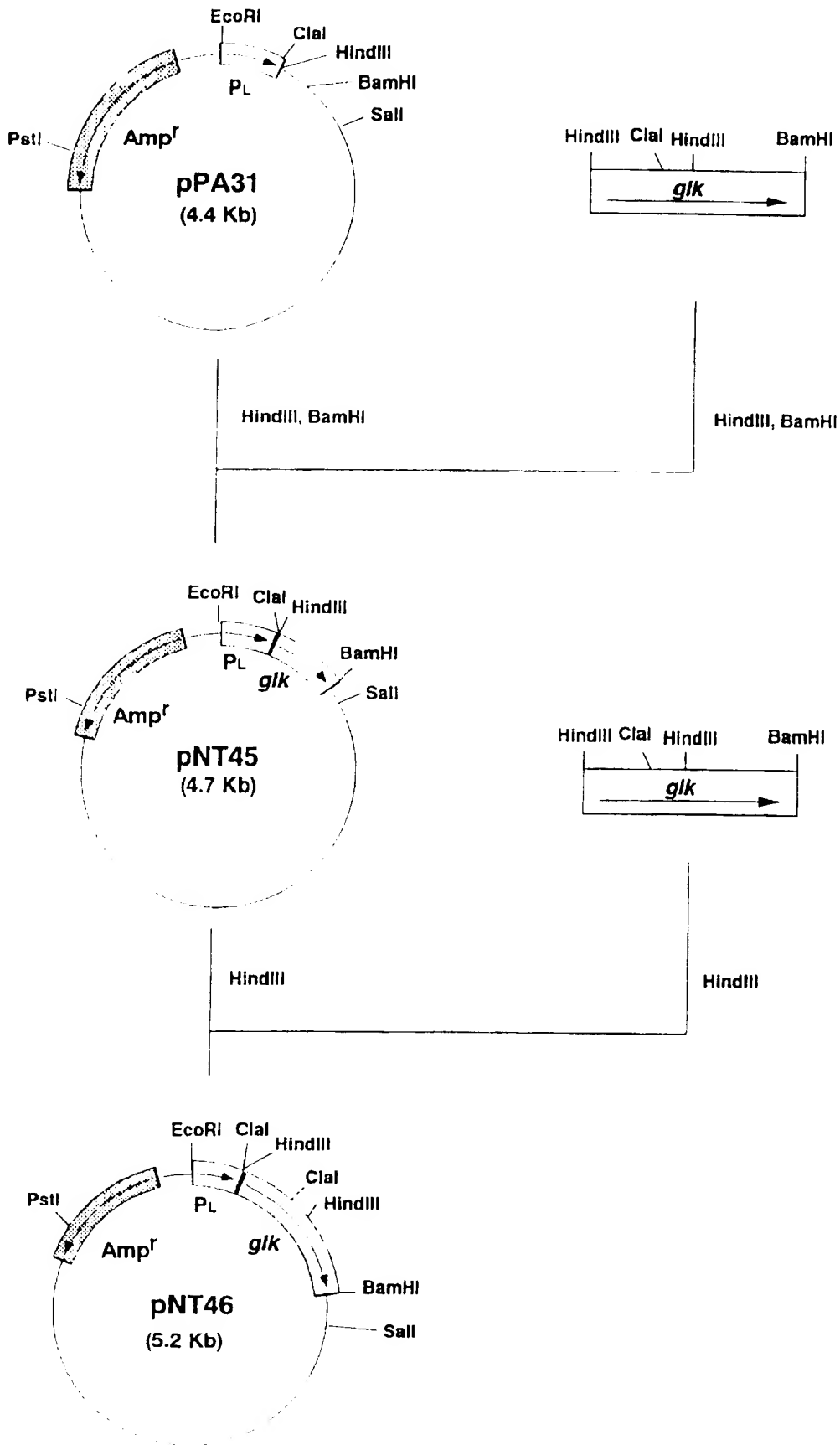
第 5 図



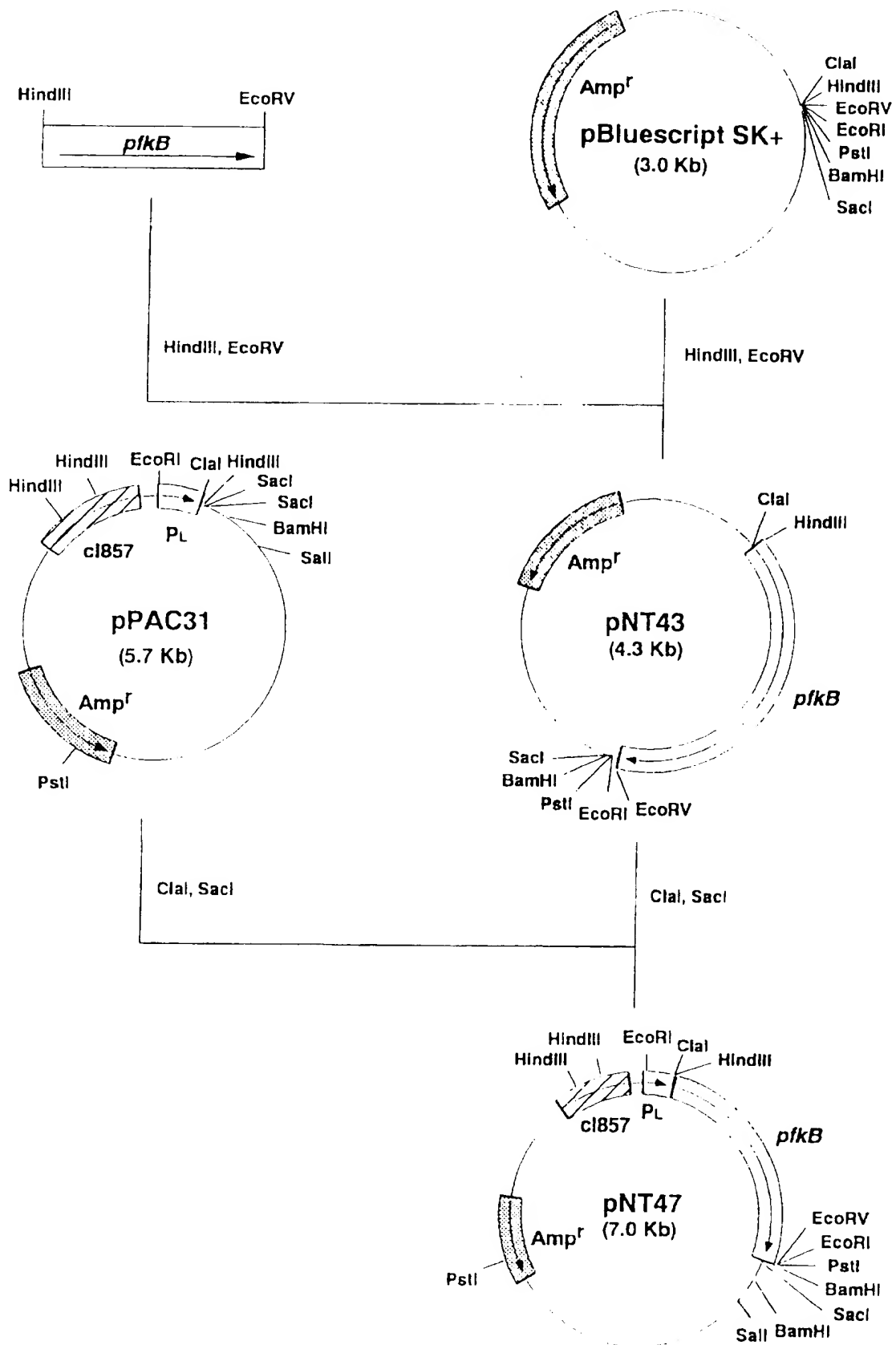
第 7 図



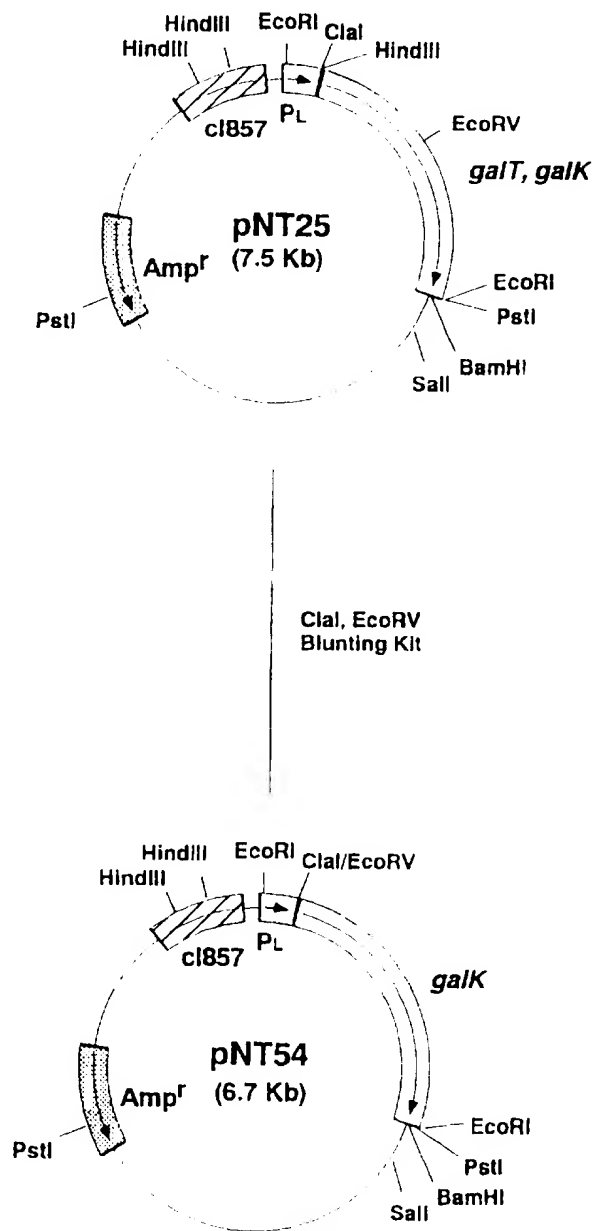
第 8 図



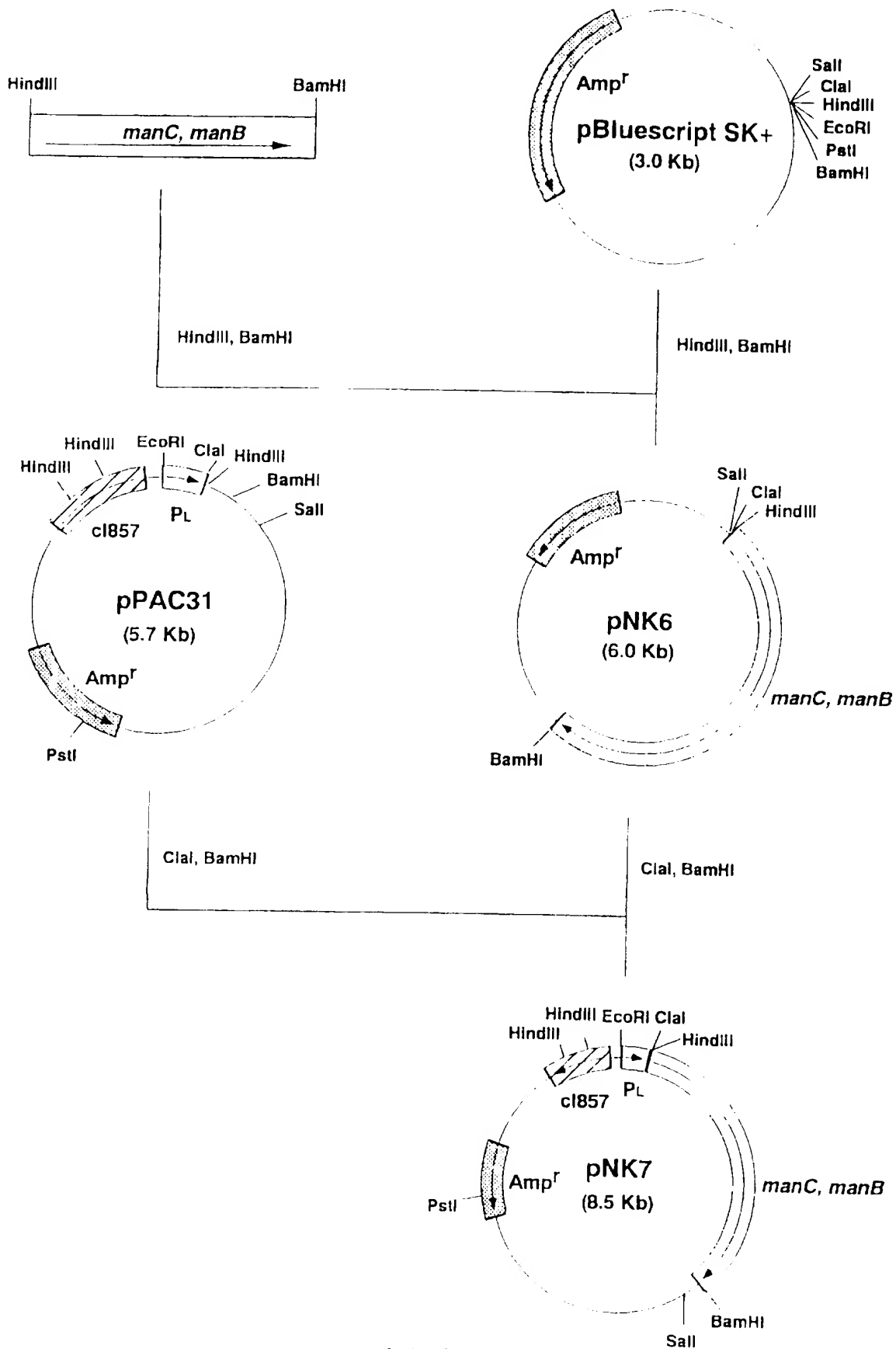
第 9 図



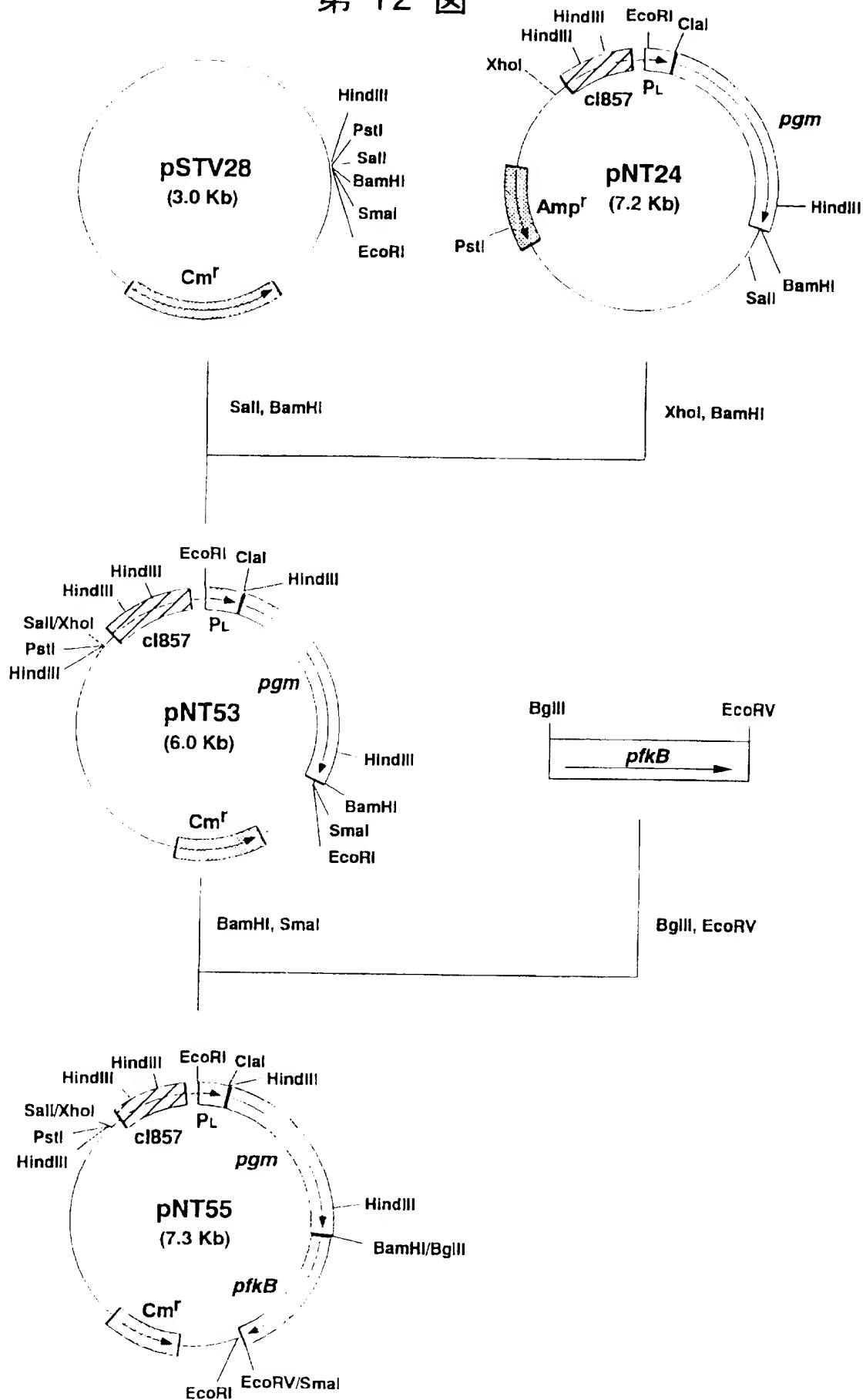
第 10 図



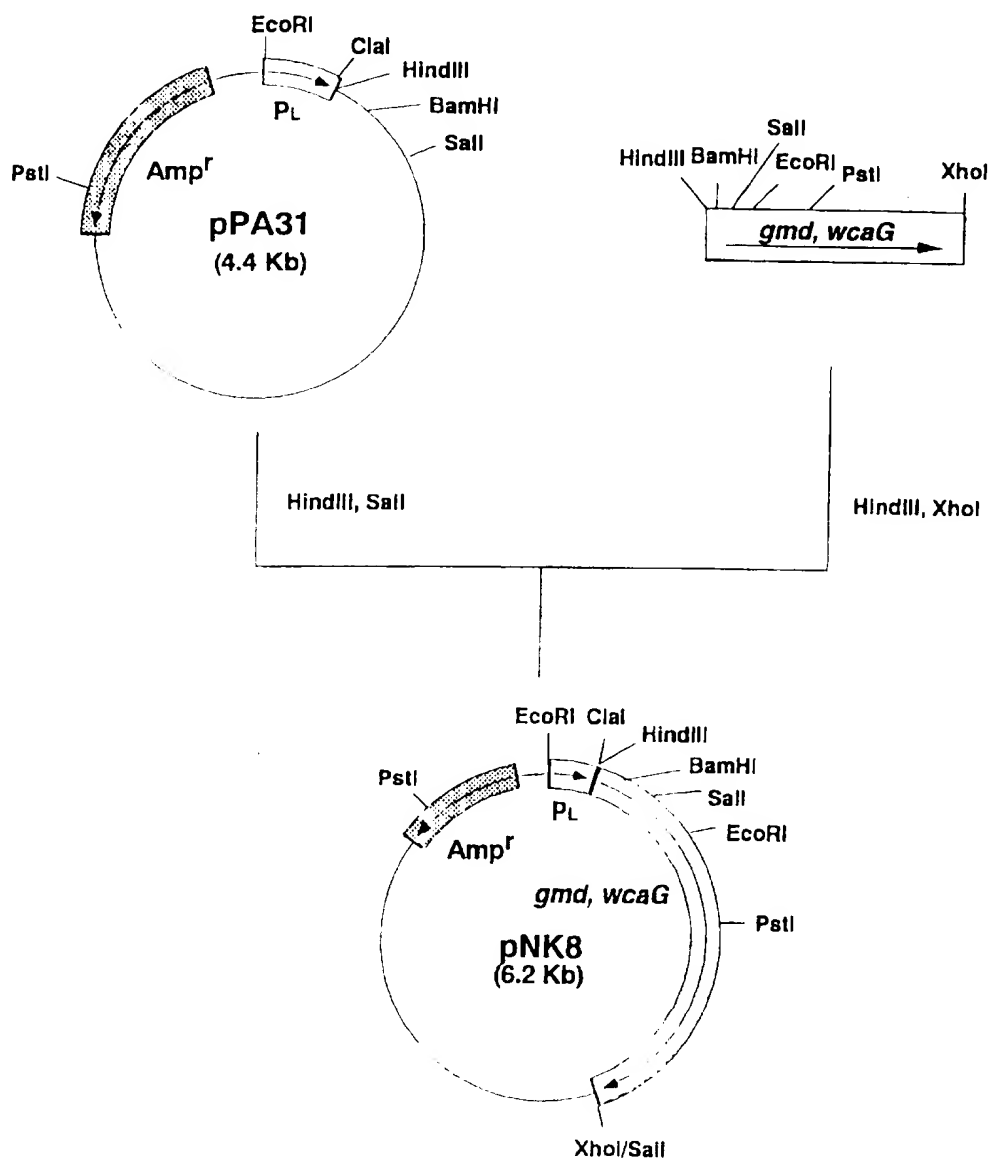
第 11 図



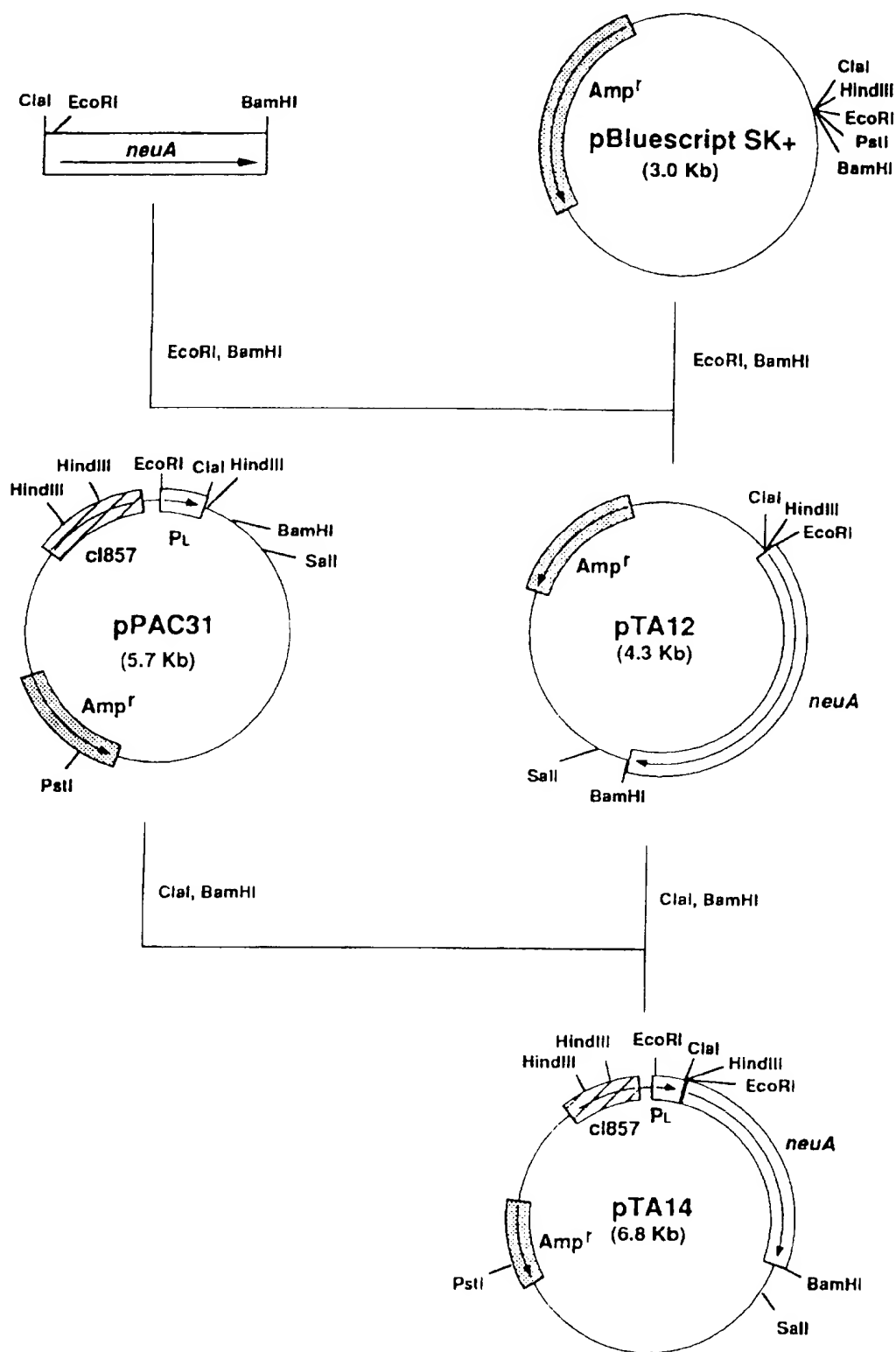
第 12 図



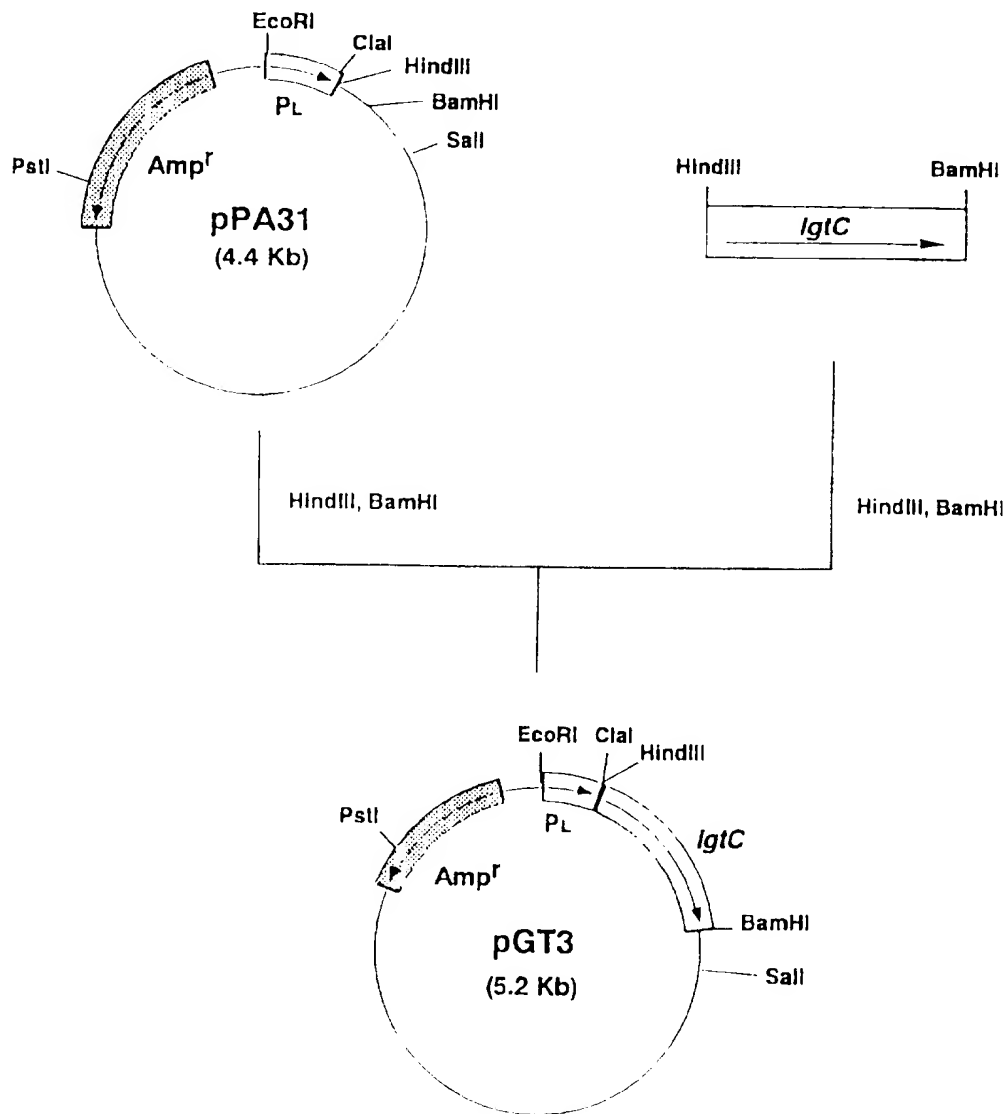
第 13 図



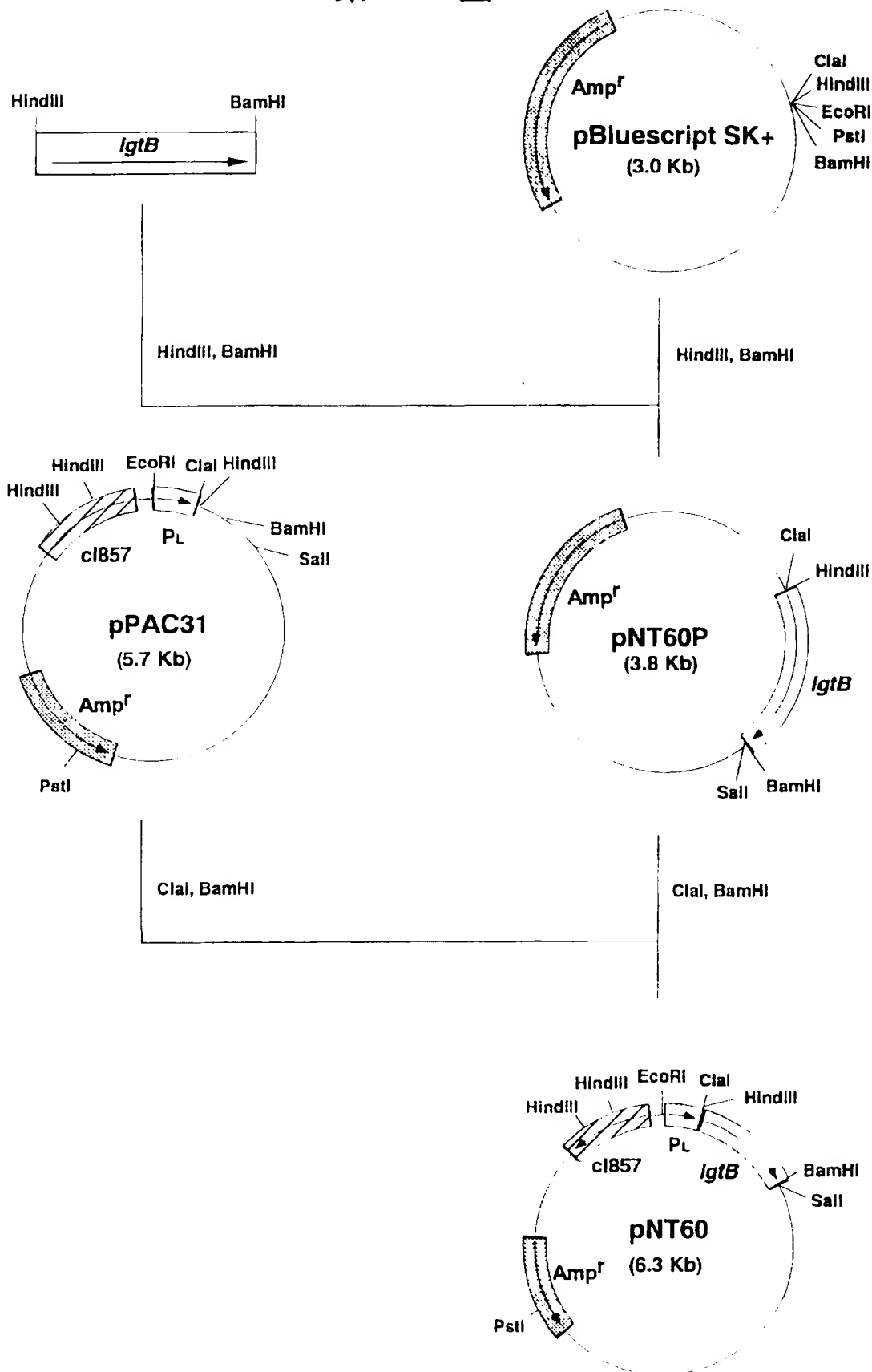
第 14 図



第 15 図



第 16 图



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03226

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12P19/26, C12N1/21, C12N15/54, C12N5/16 // (C12P19/26, C12R1:19, C12R1:15)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12P19/26, C12N1/21, C12N15/54, C12N5/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP, 47-1837, B1 (Koichi Ogata), January 19, 1972 (19. 01. 72) (Family: none)	1, 4-8 2-3, 9-61
X Y	JP, 46-40756, B1 (Koichi Ogata), December 1, 1971 (01. 12. 71) (Family: none)	1, 4-8 2-3, 9-61
X Y	JP, 62-134096, A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), June 17, 1987 (17. 06. 87) (Family: none)	1, 4-8 2-3, 9-61
X Y	JP, 47-46351, B1 (Marukin Shoyu Co., Ltd.), November 22, 1972 (22. 11. 72) (Family: none)	1, 4-8 2-3, 9-61
X Y	JP, 57-18893, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), January 30, 1982 (30. 01. 82) (Family: none)	1, 4-8 2-3, 9-61
X Y	JP, 7-233187, A (Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd.), September 5, 1995 (05. 09. 95) (Family: none)	1, 4-8 2-3, 9-61

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
December 11, 1997 (11. 12. 97)

Date of mailing of the international search report
January 13, 1998 (13. 01. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03226

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 1-500560, A (Getty Sci. Dev. Co.), March 1, 1989 (01. 03. 89) & WO, 87/05937, A & NO, 179875, B & EP, 380470, B	15 - 61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03226

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The common matter in Claims 1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, and 58-61 is a process for producing sugar nucleotides as set forth in Claim 1.

However, the search conducted has revealed that these processes are not novel ones but the ones disclosed in Reference 1 (JP, 47-1837, B (Koichi Ogata) Jan. 1, 1972 (19. 01. 72)), Reference 2 (JP, 46-40756, B (Koichi Ogata), Dec. 1, 1971 (01. 12. 71)) and Reference 3 (JP, 62-134096, A, Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), June 17, 1987 (17. 06. 87)). (The enzyme source described in Claim 1, i.e., a culture of a microorganism, includes cells obtained by centrifuging the culture and an enzymatic preparation obtained by

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

extracting these cells after being mechanically disrupted, as described in Claim 4. It is stated in the references that the enzyme sources usable in References 1 and 2 and the microorganisms usable in Reference 3 involve not only the cells per se and cultures containing the cells, but also disrupted cells, cell extracts, etc. Thus, the enzyme source as described in Claim 1 corresponds to the enzyme sources in References 1 and 2 and the microorganisms in Reference 3. Accordingly, there is no difference among them.)

Consequently, the process for producing sugar nucleotides as claimed in Claim 1 does not lie outside the category of the prior art and, therefore, the common matter (the invention of Claim 1) is not a special technical feature under the provisions of the second sentence of Rule 13(2) of the Regulations under the PCT.

Therefore, there is no common matter in Claims 1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, and 58-61. Since there is no common feature regarded as a special technical feature under the provisions of the second sentence of Rule 13(2) of the Regulations under the PCT, these inventions differing from each other are not technically linked to each other under the provisions of Rule 13 of the Regulations under the PCT. Such being the case, the inventions of Claims 1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, and 58-61 do not comply with the requirement of unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12P19/26, C12N1/21, C12N15/54, C12N5/16//
(C12P19/26, C12R1:19, C12R1:15)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12P19/26, C12N1/21, C12N15/54, C12N5/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, 47-1837, B1 (緒方浩一) 19. 1月. 1972 (19. 01. 72) (ファミリーなし)	1, 4-8 2-3, 9-61
X Y	JP, 46-40756, B1 (緒方浩一) 1. 12月. 1971 (01. 12. 71) (ファミリーなし)	1, 4-8 2-3, 9-61
X Y	JP, 62-134096, A (雪印乳業株式会社) 17. 6月. 1987 (17. 06. 87) (ファミリーなし)	1, 4-8 2-3, 9-61

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 12. 97

国際調査報告の発送日

13.01.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田 中 倫 子

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 47-46351, B1 (丸金番油株式会社)	1、4-8
Y	22. 11月. 1972 (22. 11. 72) (ファミリーなし)	2-3, 9-61
X	J P, 57-18893, A (旭化成工業株式会社)	1、4-8
Y	30. 1月. 1982 (30. 01. 82) (ファミリーなし)	2-3, 9-61
X	J P, 7-233187, A (扶桑薬品工業株式会社)	1、4-8
Y	5. 9月. 1995 (05. 09. 95) (ファミリーなし)	2-3, 9-61
Y	J P, 1-500560, A (Getty Sci. Dev. Co.) 1. 3月. 1989 (01. 03. 89) &WO, 87/05937, A &NO, 179875, B &EP, 380470, B	15-61

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの1の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの2の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

理由は特別ページ参照のこと。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲 1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, 58-61 に共通の事項は請求の範囲 1 に記載されたとおりの糖ヌクレオチドの製造法である。

しかしながら、調査の結果、この糖ヌクレオチドの製造法は文献 1 [JP, 47-1837, B (緒方浩一) 19. 1 月. 1972 (19. 01. 72)], 文献 2 [JP, 46-40756, B (緒方浩一) 1. 12 月. 1971 (01. 12. 71)], 文献 3 [JP, 62-134096, A (雪印乳業株式会社) 17. 6 月. 1987 (17. 06. 87)] に開示されているから、新規でないことが明らかになった。

(請求の範囲 1 における酵素源、すなわち微生物の培養液の処理物とは請求の範囲 4 に記載されている通り、培養液を遠心分離して得られる細胞及びその細胞の機械的磨砕処理物より抽出して得られる酵素標品を含むものである。文献 1~2 における酵素源、及び文献 3 における微生物としては、菌体それ自体あるいは菌体を含む培養物をそのまま用いると共に、菌体磨砕物、菌体抽出物などを使用してもよいことが記載されているから、請求の範囲 1 における酵素源は、文献 1~2 における酵素源、及び文献 3 における微生物にそれぞれ該当する。よって、両者に相違はない。)

結果として請求の範囲 1 に記載されたとおりの糖ヌクレオチドの製造法は先行技術の域を出ないから、PCT 規則 13. 2 の第 2 文の意味において、この共通事項 (請求の範囲 1 の発明) は特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲 1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, 58-61 に共通の事項はない。PCT 規則 13. 2 の第 2 文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の特徴は存在しないので、それらの相違する発明の間に PCT 規則 13 の意味における技術的な連関を見いだすことはできない。結局、請求の範囲 1, 3, 4, 5, 6-7, 8, 15-16, 17-20, 21-25, 26-39, 40-57, 58-61 は発明の単一性の要件を満たしていないことが明かである。